

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Сычева Анастасия Леонидовна

**Клональная характеристика Т-клеточного ответа человека при
иммунизации инактивированными вакцинами**

1.5.3 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор
Лебедев Юрий Борисович

Москва - 2023

Содержание

1. Введение.....	5
2. Обзор литературы.....	8
2.1. Т-клеточный иммунитет.....	8
2.1.1. Строение и формирование $\alpha\beta$ TCR.....	8
2.1.2. Селекция в тимусе.....	11
2.1.3. Т-клеточный ответ.....	12
2.1.4. Формирование Т-клеточной памяти.....	17
2.2. Влияние вакцинации на Т-клеточный иммунитет.....	18
2.2.1. Вакцина против гриппа.....	19
2.2.2. Вакцина против клещевого энцефалита.....	21
2.3. Изучение Т-клеточного ответа с помощью методов высокопроизводительного секвенирования.....	25
2.3.1. Методы пробоподготовки для HTS.....	25
2.3.2. Биоинформатическая обработка данных секвенирования.....	27
2.3.3. Стратегии анализа репертуаров TCR и их применение в изучении Т-клеточного ответа на вакцинацию.....	28
3. Материалы и методы.....	31
3.1. Доноры и сбор образцов.....	31
3.2. Определение концентрации IgG, специфичных к вирусу КЭ, в сыворотке крови.....	31
3.3. Выделение PBMCs методом градиентного центрифугирования.....	32
3.4. Выделение CD4 ⁺ и CD8 ⁺ Т-клеток.....	32
3.5. Выделение “non-naïve” Т-клеток.....	33
3.6. Выделение CD45RO ⁺ Т-клеток.....	33
3.7. Стимуляция PBMCs <i>in vitro</i> и выделение активированных Т-клеток.....	34
3.8. Выделение РНК из образцов лизированных клеток.....	36
3.9. Получение библиотек кДНК β -цепей TCR PBMCs и больших субпопуляций Т-клеток.....	36
3.10. Получение библиотек кДНК β -цепей TCR <i>in vitro</i> стимулированных Т-клеток.....	38
3.11. Получения библиотек для секвенирования транскриптома <i>in vitro</i> стимулированных Т-клеток.....	40

3.12. Обработка и анализ данных секвенирования.....	41
3.12.1. Реконструкция репертуаров κДНК β-цепей TCR.....	41
3.12.2. Транскриптомы <i>in vitro</i> стимулированных Т-клеток.....	42
3.12.3. Программы и пакеты, использованные для анализа и визуализации данных.....	43
4. Результаты и обсуждение.....	44
4.1. Дизайн исследований.....	44
4.2. Получение и обработка данных секвенирования.....	45
4.2.1. Репертуары β-цепей TCR PBMCS и больших субпопуляций Т-клеток.....	45
4.2.2. Репертуары β-цепей TCR <i>in vitro</i> стимулированных Т-клеток.....	46
4.2.3. Транскрипционные профили <i>in vitro</i> стимулированных Т-клеток.....	47
4.3. Изучение Т-клеточного ответа на противогриппозную вакцинацию.....	47
4.3.1. Анализ вакцин-индуцированной клональной экспансии.....	47
4.3.2. Обнаружение “новых” клонов среди “non-naïve” Т-клеток.....	49
4.4. Изучение Т-клеточного ответа на вакцину против КЭ.....	52
4.4.1. Поиск вакцин-ассоциированных клонов и анализ их динамики.....	52
4.4.2. Фенотипические особенности Т-клеток вакцин-ассоциированных клонов.....	55
4.4.3. Изучение динамики отдельных групп вакцин-ассоциированных клонов.....	59
4.4.4. Сравнение аминокислотных последовательностей β-цепи TCR вакцин-ассоциированных клонов.....	63
4.4.5. Сходство аминокислотных последовательностей β-цепей TCR вакцин-ассоциированных клонов разных доноров.....	66
4.4.6. Анализ репертуаров β-цепей TCR субпопуляций <i>in vitro</i> стимулированных Т-клеток.....	71
4.4.7. Сравнение транскрипционных профилей субпопуляций <i>in vitro</i> стимулированных Т-клеток.....	73
5. Заключение.....	75
6. Выводы.....	77
7. Благодарности.....	78
8. Список сокращений.....	79
9. Список литературы.....	80
Приложения.....	92

Приложение А. Структура олигонуклеотидов, использованных при подготовке библиотек кДНК β -цепей TCR к секвенированию.....	92
Приложение Б. Полный перечень библиотек с указанием количества полученных прочтений и результатов первичной обработки.....	93
Приложение В. Информация о донорах, участвовавших в исследовании влияния вакцинации против КЭ на Т-клеточный иммунитет.....	103

1. Введение

Актуальность темы исследования

На сегодняшний день вакцинация – один из самых эффективных способов борьбы с инфекциями, поэтому на создание новых и улучшение уже имеющихся вакцин направлены значительные ресурсы. Для каждой новой вакцины требуется проверка её иммуногенности, и до недавнего времени основным проверяемым параметром был титр нейтрализующих антител [1]. Однако, в борьбе с патогенами помимо антител участвуют и Т-клетки, без которых невозможна полная элиминация вирусных возбудителей. Кроме того, Т-клетки играют важную роль в формировании иммунологической памяти и выработке высокоаффинных антител, а также могут распознавать многие консервативные эпитопы внутренних белков вируса, которые недоступны для антител. Таким образом, способность стимулировать Т-клеточный иммунитет является не менее значимым критерием в оценке иммуногенности вакцины.

Золотым стандартом для измерения антиген-специфичного Т-клеточного ответа на вакцинацию считается ELISpot (англ. *enzyme-linked immunosorbent spot*) [2], который, как и ряд других методов, основан на анализе фенотипических свойств Т-клеток [3]. Однако, часто получаемые результаты дают только общую оценку реакции Т-клеточного иммунитета, не отражая особенности процессов, лежащих в основе иммунного ответа. В частности, по изменению уровня продукции цитокинов или экспрессии поверхностных маркеров невозможно охарактеризовать клональное разнообразие отвечающих Т-клеток, хотя именно на активации и экспансии отдельных Т-клеточных клонов (Т-клеток с идентичным антиген-распознающим Т-клеточным рецептором) основан антиген-специфичный иммунный ответ. Кроме того, в большинстве проводимых тестах требуется предварительная стимуляция Т-клеток *in vitro*, что может вносить искажения в интерпретацию данных с точки зрения ответа *in vivo*.

Вместе с тем, благодаря развитию технологии высокопроизводительного секвенирования стало возможным глубокое профилирование репертуара Т-клеточных рецепторов (англ. *T cell receptor*, TCR) всех присутствующих в образце Т-клеток или предварительно выделенных субпопуляций. Реорганизации репертуара, возникающая под действием инфекции или вакцинации, отражает изменения численности и фенотипических свойств отвечающих Т-клеточных клонов. Таким образом, мы получили инструмент для детекции и отслеживания даже незначительных изменений в Т-клеточном иммунитете.

Для изучения особенностей Т-клеточного ответа на инактивированные вакцины методом высокопроизводительного секвенирования мы выбрали две уже одобренные и широко применяемые вакцины против гриппа и клещевого энцефалита, которые при этом содержат

различные типы антигенов и имеют разные схемы вакцинации. Однако, несмотря на доказанную эффективность, в обоих случаях требуется регулярная ревакцинация для поддержания защитного иммунитета на протяжении всей жизни. Кроме того, известны случаи прорывных инфекций, которые могут приводить к серьёзным осложнениям и даже смерти [4,5]. Новые данные об особенностях Т-клеточного ответа и формировании иммунологической памяти помогут лучше понять механизмы, лежащие в основе действия выбранных вакцин, и в дальнейшем могут способствовать улучшению современных протоколов иммунизации или созданию новых вакцин.

Цель работы и основные задачи исследования

Целью работы является изучение динамики, фенотипических свойств и клонального состава Т-клеточного ответа на вакцины против гриппа и клещевого энцефалита.

Для этого были поставлены следующие **задачи**:

- 1) получить библиотеки и реконструировать репертуары кДНК β-цепей TCR из образцов периферической крови здоровых доноров до и после вакцинации против гриппа или клещевого энцефалита;
- 2) с помощью статистических методов идентифицировать вакцин-ассоциированные Т-клеточные клоны и изучить особенности их динамики в ходе вакцинации;
- 3) используя репертуары кДНК β-цепей TCR отдельных субпопуляций охарактеризовать фенотипические свойства Т-клеток вакцин-ассоциированных клонов;
- 4) изучить особенности формирования Т-клеточной памяти в ответ на вакцинацию;
- 5) выполнить сравнительный анализ аминокислотных последовательностей антиген-распознающих участков β-цепей TCR вакцин-ассоциированных клонов.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы

В проведённом исследовании впервые был изучен Т-клеточный ответ на вакцины против гриппа и клещевого энцефалита на уровне отдельных клонов. В каждом случае мы показали экспансию вакцин-ассоциированных клонов и формирование иммунологической памяти в результате вакцинации. Благодаря глубокому секвенированию репертуаров β-цепей TCR мы смогли отследить изменения представленности сотен клонов и выделить несколько волн клональной экспансии в ответ на двухэтапную вакцинацию против клещевого энцефалита (КЭ). Каждой волне были свойственны разные скорость и сила экспансии, а также разный вклад в образование новых Т-клеток памяти.

По результатам фенотипического анализа было выявлено преобладание CD4⁺ Т-клеточного ответа на обе инактивированные вакцины. Но при этом мы впервые показали, что вакцина против КЭ способна индуцировать CD8⁺ Т-клеточный ответ, что указывает на

возможные недостатки применения методов, требующих стимуляцию *in vitro* (например, внутриклеточное окрашивание цитокинов и анализ клеточной пролиферации) [6–8], при изучении Т-клеточного ответа на инактивированные вакцины.

Также мы показали образование десятков кластеров клонов с похожей антигенной специфичностью у доноров, вакцинированных против КЭ. Кластеры были образованы как среди клонов одного донора, так и между разными донорами. В первом случае мы получили свидетельство конвергентной селекции вакцин-ассоциированных клонов с большим диапазоном антигенной специфичности, а во втором – общие мотивы клонов, вероятно специфичных к иммунодоминантным эпитопам вируса КЭ, что в сочетании с известными аллелями HLA для каждого донора может помочь в создании первых мультимеров с антигенами вируса КЭ.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Иммунизация субъединичной вакциной против гриппа и инактивированной цельновирионной вакциной против клещевого энцефалита вызывает продолжительный выраженный Т-клеточный ответ.
- 2) В результате вакцинация против гриппа и клещевого энцефалита происходит формирование новых Т-клеток памяти.
- 3) Т-клеточный ответ на двухэтапную вакцинацию против клещевого энцефалита состоит из нескольких волн клональной экспансии, Т-клетки которых вносят разный вклад в формирование иммунологической памяти.
- 4) Кластерный анализ показал широкий спектр антигенной специфичности клонов, ассоциированных с ответом на вакцину против клещевого энцефалита.
- 5) Общие мотивы, образованные вакцин-ассоциированными клонами, свидетельствуют о наличии иммунодоминантных эпитопов в составе вакцины против клещевого энцефалита.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием стандартных молекулярно-биологических методов и сертифицированных наборов для пробоподготовки, а также тщательным подбором статистических подходов к анализу данных.

Основные результаты диссертационной работы были представлены на всероссийских и международных конференциях в формате устных и стендовых докладов и опубликованы в виде 6 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science. Во всех работах диссертант является первым автором, автором с равным вкладом или автором, внесшим существенный вклад в разделы статьи, соответствующие теме диссертации.

2. Обзор литературы

2.1. Т-клеточный иммунитет

Т-клеточный иммунитет является одной из ветвей адаптивной иммунной системы, способной специфически распознавать и запоминать патогены. Т-клетки выполняют широкий спектр защитных функций организма: уничтожают инфицированные клетки, активируют другие клетки иммунной системы и способствуют выполнению их эффекторных функций или, наоборот, подавляют развитие патологических иммунных реакций [9].

Специфическое распознавание отдельного патогена достигается благодаря большому разнообразию антиген-распознающих Т-клеточных рецепторов (TCR), которые формируются во время созревания Т-клеток в тимусе. TCR является гетеродимером и состоит из двух полипептидных цепей, на основе которых выделяют две разновидности рецептора: $\alpha\beta$ TCR и $\gamma\delta$ TCR, представленных на поверхности двух различных типов Т-клеток. Большинство Т-клеток экспрессируют $\alpha\beta$ TCR (конвенциональные Т-клетки) и распознают фрагменты чужеродных белков в составе главного комплекса гистосовместимости (англ. *major histocompatibility complex*, МНС).

2.1.1. Строение и формирование $\alpha\beta$ TCR

Каждая из цепей $\alpha\beta$ TCR представляет собой трансмембранный белок с двумя внеклеточными иммуноглобулин-подобными доменами: переменным и константным (Рисунок 1А). В распознавании комплекса пептид-МНС (pMHC) участвует 6 высоко переменных петель (по 3 на каждой цепи), которые также называют участками, определяющими комплементарность (англ. *complementarity determining region*, CDR). Первые два CDR (CDR1 и CDR2) закодированы в гене V-сегмента TCR, в то время как CDR3 формируется в ходе соматической рекомбинации ДНК V-, D- и J-сегментов (V(D)J-рекомбинация) двух локусов - TRA и TRB, кодирующих α - и β -цепь TCR, соответственно. В итоге для каждой цепи формируется ген (Рисунок 1Б), состоящий из нескольких сегментов: V (англ. *variable*), D (англ. *diversity*, нет у α -цепи), J (англ. *joining*) и C (англ. *constant*) с дополнительными нуклеотидными вставками между V-, D- и J-сегментами [10].

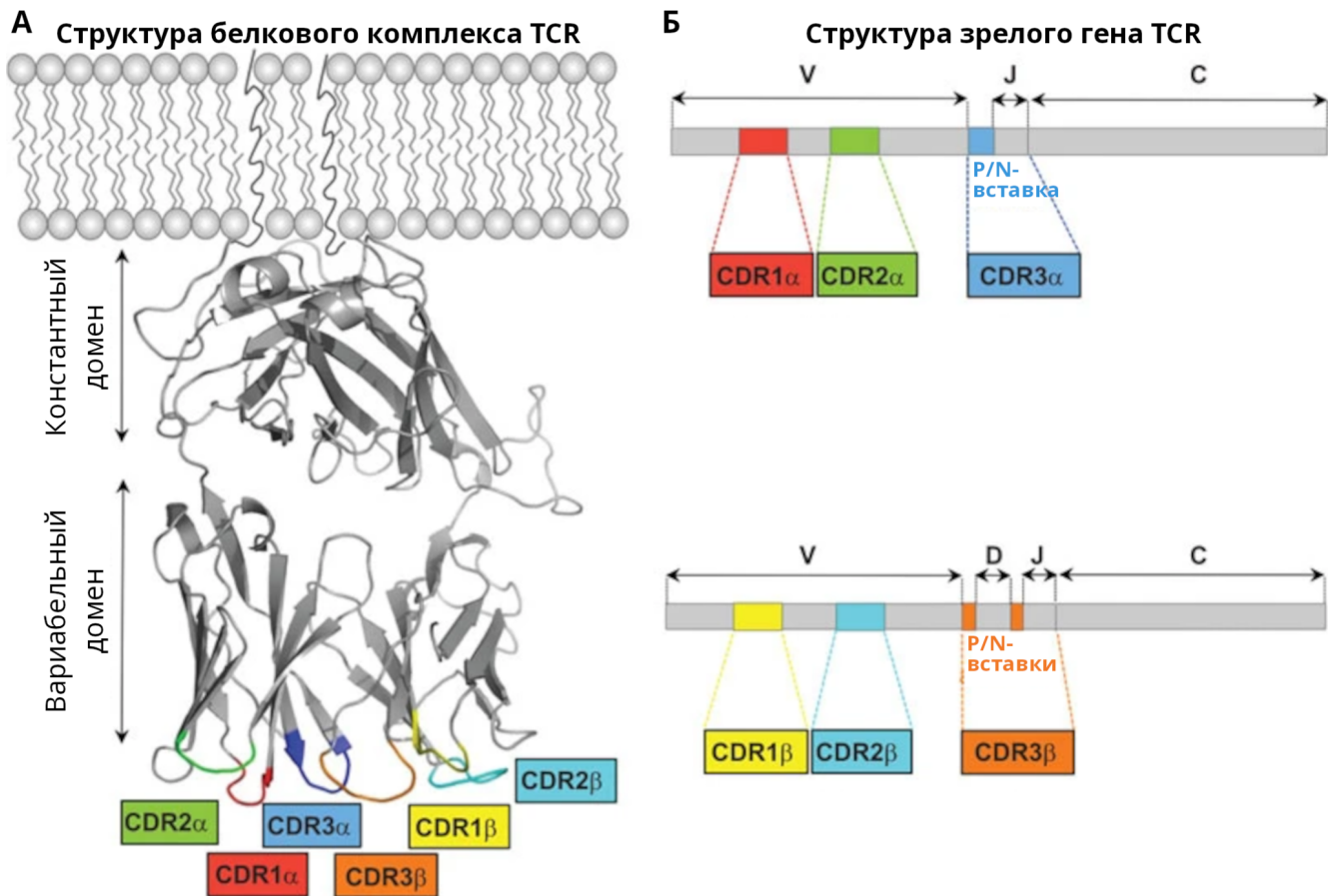
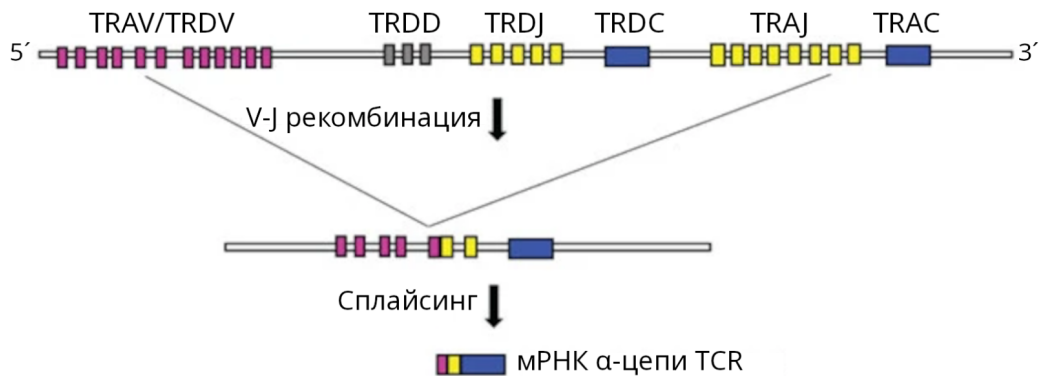


Рисунок 1. Строение белкового комплекса $\alpha\beta$ TCR (А) и зрелых генов α - и β -цепей (Б). CDR3 α -цепи образуется на стыке V- и J-сегментов (захватывая их 5'- и 3'-конец, соответственно) со вставкой дополнительных нуклеотидов (P/N) между ними. CDR3 β -цепи состоит из 5'-конца V-сегмента, D-сегмента и 3'-конца J-сегмента. На стыках между сегментами зрелого гена β -цепи также есть вставки дополнительных нуклеотидов (P/N). Адаптировано из [10].

В геноме закодировано множество вариантов для каждого сегмента, но только один из вариантов оказывается в составе зрелого гена цепи TCR (Рисунок 2). У человека локус *TRA* расположен на коротком плече хромосомы 14q и содержит 47 вариантов V-сегмента (TRAV), 61 вариант J-сегмента (TRAJ) и 1 вариант C-сегмента (TRAC). Локус *TRB* расположен на коротком плече хромосомы 7q и содержит 60 вариантов V-сегмента (TRBV), 2 варианта D-сегмента (TRBD), 14 вариантов J-сегмента (TRBJ) и 2 варианта C-сегмента (TRBC) [11]. Выбор варианта для каждого из сегментов происходит во время V(D)J-рекомбинации. На этот процесс влияет пространственная близость участков генома [12,13], доступность хроматина для рекомбинационного комплекса и индивидуальные генетические факторы [14–17].

Рекомбинация локуса TRA



Рекомбинация локуса TRB

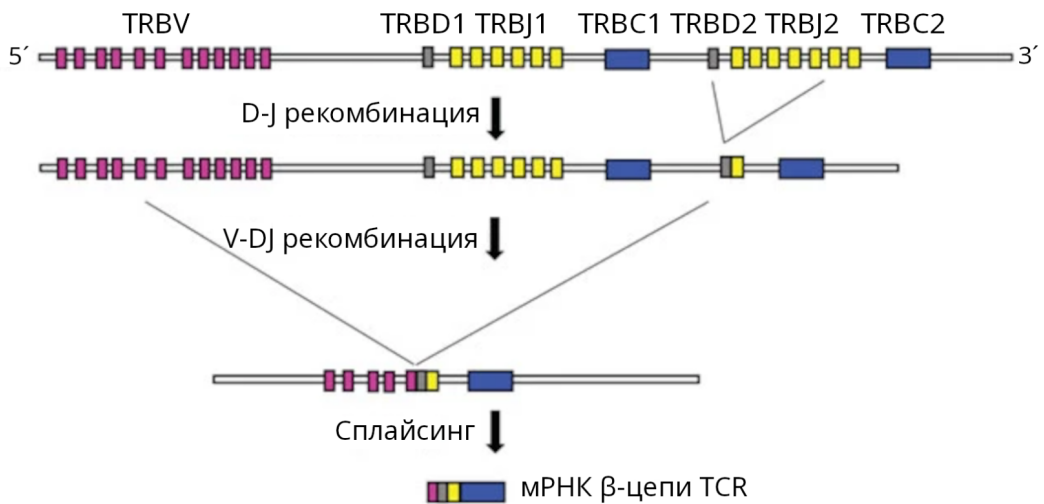


Рисунок 2. Схема строения локусов TRA и TRB, ДНК после V(D)J-рекомбинации и РНК-транскрипта. Для α -цепи TCR в процессе рекомбинации соединяются по одному из вариантов V- и J-сегментов, для β -цепи – рекомбинация проходит в 2 этапа: сначала соединяются D- и J-сегменты, а затем к ним добавляется V-сегмент. Адаптировано из [10].

Каждый вариант V-, D- и J-сегментов фланкирован рекомбинационными сигнальными последовательностями (англ. *recombination signal sequences*, RSS). Белки рекомбинационного комплекса RAG1/RAG2 (англ. *recombination activating gene 1/2*) связываются с RSS двух сегментов и формируют парный комплекс, внутри которого вносят двунитевые разрывы между ДНК сегмента и RSS с образованием шпильки на конце ДНК сегмента [18]. В дальнейшем гетеродимер Ku70/Ku80 удерживает концы сегментов рядом и привлекает компоненты системы репарации ДНК. Экзонуклеаза Artemis при участии каталитической субъединицы ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-ПКс) разрезает шпильку с образованием липких концов. Более короткая цепь достраивается ДНК-полимеразой, образуя небольшую палиндромную вставку (P-нуклеотидная вставка, от англ. *palindromic*). Затем терминальная

дезоксинуклеотидилтрансфераза (TdT) нематрично добавляет нуклеотиды к 3'-концам каждого фрагмента (N-нуклеотидная вставка, от англ. *non-template*). Именно N-вставка вносит наибольший вклад в вариабельность цепей TCR. В завершение V(D)J-рекомбинации сегменты с новыми вставками сшиваются по механизму негомологичного соединения концов (англ. *non-homologous end joining*, NHEJ), который допускает как потерю, так и добавление новых нуклеотидов на стыке цепей ДНК [19].

Рекомбинация α - и β -цепей разнесены во времени и пространстве благодаря запуску перестройки на разных этапах созревания Т-лимфоцита (или тимоцита). Перестройка гена β -цепи происходит на стадии, когда клетка ещё не имеет ко-рецепторов CD4 или CD8 (англ. *double-negative*, DN, или CD4⁻CD8⁻). В случае успешной рекомбинации функциональная β -цепь презентуется на поверхности клетки вместе с pTcR (инвариантной суррогатной α -цепью) и субъединицами CD3, формируя комплекс pTcR-CD3 . Правильная сборка рецепторного комплекса запускает несколько циклов клеточного деления и экспрессию обоих ко-рецепторов CD4 и CD8 (англ. *double-positive*, DP, или CD4⁺CD8⁺) [20,21]. Во время перестройки β -цепи соблюдается принцип аллельного исключения, который допускает одновременную рекомбинацию только на одной из аллелей TRB. Если в результате первой попытки не была сформирована функциональная β -цепь, то активируется вторая аллель, в противном случае рекомбинация прекращается: деградирует комплекс RAG1/RAG2 и конденсируется хроматин, содержащий TRB. Тем не менее, примерно в 1% случаев происходит нарушение механизмов аллельного исключения и возникают Т-клетки, экспрессирующие на поверхности два варианта β -цепи [22].

На стадии DP вновь активируется экспрессия генов *RAG1* и *RAG2* и запускается перестройка α -цепи. При этом рекомбинация проходит одновременно на обеих аллелях и может повторяться несколько раз (в среднем – 5 раундов VJ-рекомбинации на каждой аллели) [23]. Из-за отсутствия механизмов аллельного исключения в одной клетке могут сформироваться сразу две функциональные α -цепи и обе будут представлены на поверхности Т-лимфоцита – в среднем, количество таких Т-клеток составляет около 10% [22].

2.1.2. Селекция в тимусе

Процесс перестройки α -цепи тесно связан селекцией предшественников Т-клеток в тимусе. Собранный на поверхности DP тимоцита $\alpha\beta\text{TCR}$ взаимодействует с комплексом из МНС и эндогенного пептида, который представлен на поверхности эпителиальных клеток тимуса. При этом возможно взаимодействие с МНС разных классов, так как на поверхности тимоцита одновременно присутствуют ко-рецепторы CD4 и CD8, которые участвуют в распознавании МНС класса II и I, соответственно (подробнее рассматривается в разделе 2.1.3).

Успешное распознавание аутологичного комплекса рМНС означает сборку “рабочего” $\alpha\beta$ TCR, после чего прекращается рекомбинация α -цепи. Вместе с этим подавляется экспрессия одного из ко-рецепторов (CD4 или CD8, в зависимости от класса распознанного МНС) и фенотип тимоицита меняется на SP (англ. *single-positive*). Тимоициты, которым так и не удалось собрать функциональный $\alpha\beta$ TCR, погибают. Этот процесс отбора называют позитивной селекцией [20,24].

Главная опасность селекции TCR на основе эндогенных пептидов состоит в том, что отобранные TCR в дальнейшем могут спровоцировать развитие аутоиммунных заболеваний. Поэтому тимоициты, TCR которых слишком сильно связывается с комплексом рМНС (т.е. обладает высокой аффинностью), подвергаются негативной селекции и погибают. Этому фильтру подвергаются как DP, так и SP тимоициты [25]. Согласно аффинной модели селекции прошедшие отбор тимоициты имеют слабую аффинность к эндогенному комплексу рМНС: достаточную для распознавания МНС, но недостаточную для активации Т-клетки при встрече эндогенного пептида на периферии [26]. При этом часть клеток с высокоаффинными TCR даёт начало регуляторным Т-клеткам (T_{Reg}), которые могут подавлять иммунный ответ на собственные антигены и, таким образом, являются дополнительным уровнем защиты от развития аутоиммунных заболеваний [27].

В результате селекции выживает и достигает зрелости менее 5% DP тимоицитов [28,29]. Наибольшие потери происходят на этапе позитивной селекции: 75-80% тимоицитов так и не получают необходимый для выживания сигнал от TCR [30,31]. Затем ещё 50-80% от прошедших позитивный отбор клеток погибают в ходе отрицательной селекции [32–34]. Таким образом, только небольшое количество из теоретически возможных 2×10^{19} вариантов уникальных $\alpha\beta$ TCR [35] в итоге оказывается в периферических тканях и формирует репертуар антиген-распознающих рецепторов Т-клеток организма.

2.1.3. Т-клеточный ответ

Прошедшие отбор наивные Т-клетки циркулируют по организму в поисках своего антигена – комплекса рМНС. Благодаря высокой чувствительности и специфичности TCR всего нескольких молекул рМНС оказывается достаточно для активации Т-клетки [36–38]. В свою очередь, в зависимости от происхождения антигенные пептиды могут быть представлены на разных классах МНС (Рисунок 3). Фрагменты белков, синтезированных внутри клетки, представлены в составе МНС класса I, который есть на поверхности практически всех клеток организма и распознаётся Т-клеточными рецепторами $CD8^+$ Т-клеток. МНС класса II презентует фрагменты экзогенных белков и представлен на поверхности специализированных антигенпрезентирующих клеток (англ. *antigen-presenting cell*, APC), в роли

которых могут выступать дендритные клетки, макрофаги или В-клетки. Комплекс из антигенного пептида и МНС класса II узнают $CD4^+$ Т-клетки [39,40]. Также у APC были обнаружены механизмы кросс-презентации, позволяющие презентировать фрагменты экзогенных белков в составе МНС класса I и фрагменты эндогенных белков в составе МНС класса II [41,42]

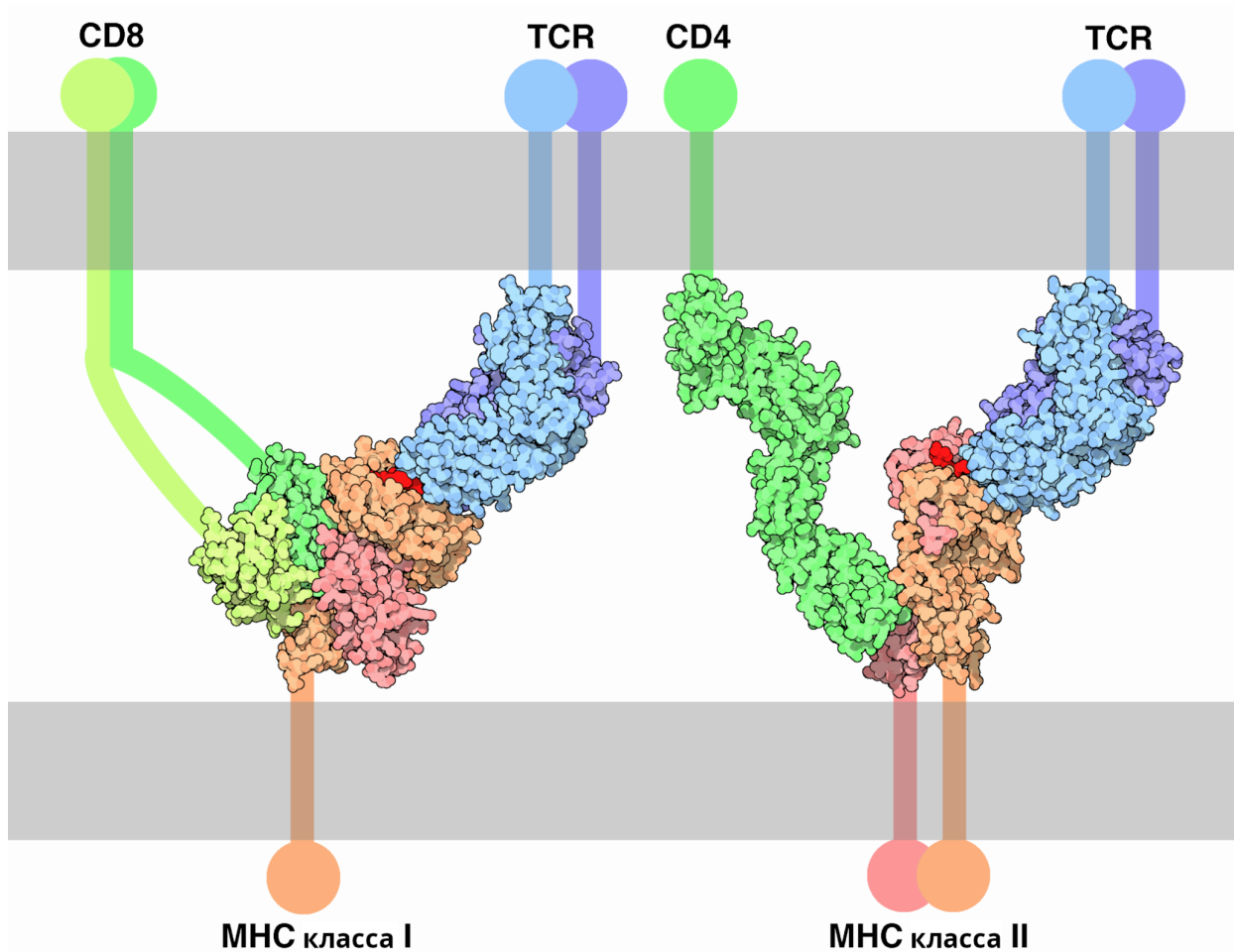


Рисунок 3. Взаимодействие TCR с комплексом рМНС. Красным цветом обозначен пептидный антиген, оранжевым и розовым – цепи субъединиц МНС, синим и голубым – цепи субъединиц TCR, зелёным и жёлтым – цепи субъединиц ко-рецепторов CD8 и CD4 [43].

Каждая молекула МНС имеет на своей поверхности структуру, формирующую бороздку, в которую укладывается антигенный пептид (Рисунок 4А). МНС класса I предпочтительно связывает пептиды длиной 8–10 аминокислотных остатков [44], в то время как открытая с боков бороздка МНС класса II позволяет связывать пептиды произвольной длины (но обычно 13–25 аминокислотных остатков) [45]. При распознавании антигенного пептида TCR взаимодействует с комплексом рМНС в диагональной ориентации относительно пептид-связывающей бороздки (Рисунок 4Б) таким образом, что α -цепь TCR контактирует с N-концевой частью пептида, β -цепь

— с С-концевой [46]. При этом решающий вклад в распознавание пептида вносит гипервариабельный участок CDR3 обеих цепей, а менее вариабельные участки CDR1 и CDR2 распознают прилегающие участки молекул МНС. Однако, взаимодействие между TCR и рМНС не является жёстко зафиксированным и допускает значительную вариабельность как в ориентации TCR, так и в контактирующих регионах [47,48].

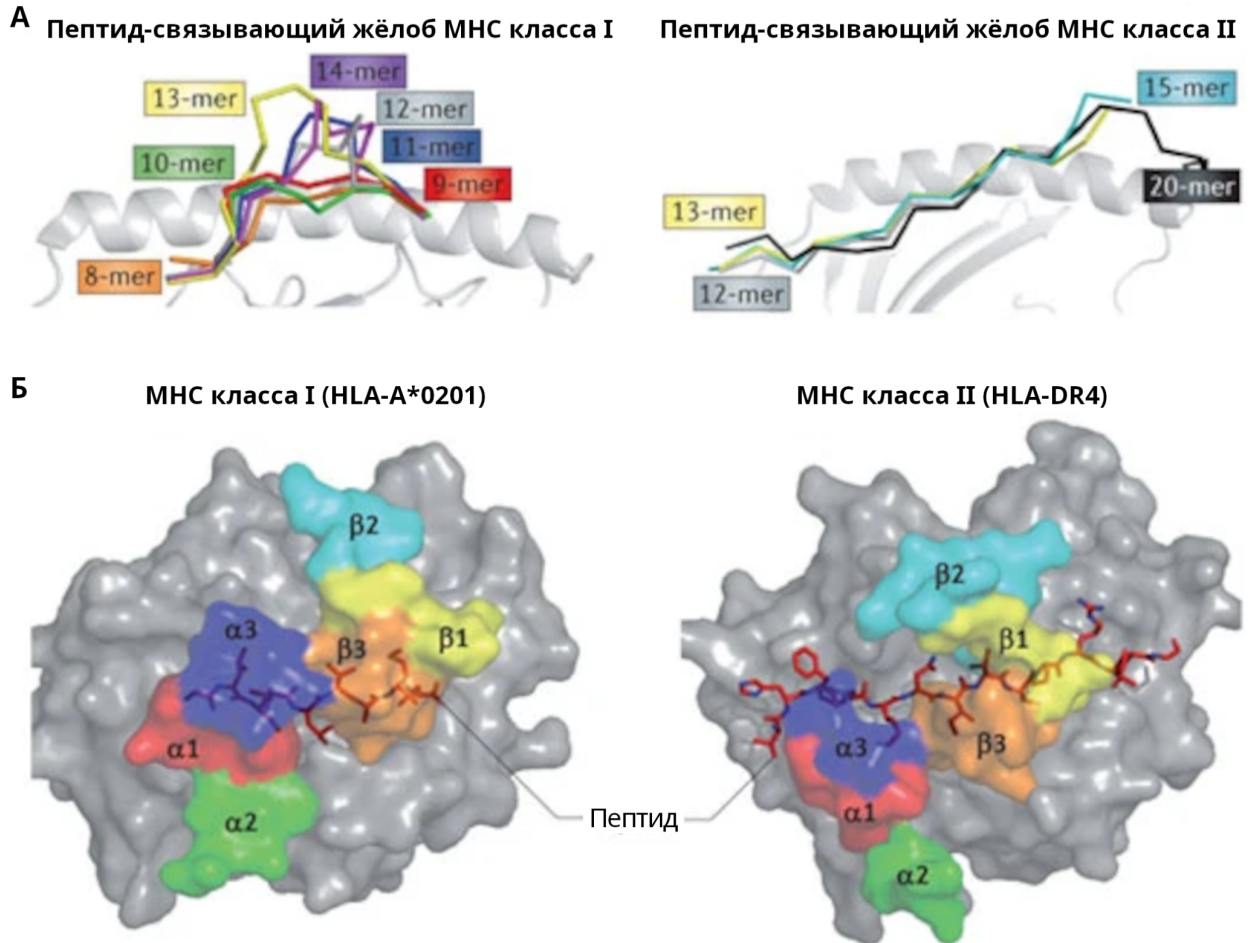


Рисунок 4. Презентация пептида молекулой МНС. **А.** Расположение пептидов разной длины в жёлобе МНС классов I и II. Замкнутая структура жёлоба МНС класса I приводит к “выгибанию” длинных пептидов. **Б.** Область взаимодействия TCR с комплексом рМНС. Серым цветом обозначены молекулы МНС: аллель HLA-A*0201 (класс I) презентует иммунодоминантный пептид GLCTLVAML вируса Эпштейна-Барр, аллель HLA-DR4 (класс II) – фрагмент основного белка миелина. TCR взаимодействует с комплексом рМНС в диагональной ориентации относительно жёлоба с пептидом. Области контакта петель CDR α - и β -цепей с комплексом обозначены шестью цветами и пронумерованы в соответствии с номерами CDR. Адаптировано из [49].

МНС обладает высокой полиморфностью и может связывать разные наборы пептидов [50]. В геноме человека гены МНС, который также называют HLA (англ. *human leukocyte antigen*), сосредоточены в одном локусе на коротком плече хромосомы 6: на теломерном конце региона располагаются гены HLA класса I (*HLA-A*, *HLA-B* и *HLA-C*), а на центромерном – класса II (*HLA-DRA*, *HLA-DRB1*, *HLA-DRB3*, *HLA-DRB4*, *HLA-DRB5*, *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1*, *HLA-DPA1* и *HLA-DPB1*). Суммарно известно более 1500 вариантов аллелей HLA [51], поэтому результирующий пул эпитопов, распознаваемых Т-клетками, будет уникальным для каждого организма. Это обстоятельство имеет огромное значение для выживания популяции, так как для любого нового патогена найдётся достаточно вариантов аллелей МНС, способных эффективно представить его фрагменты Т-клеткам. По этой же причине мы наблюдаем широкий диапазон индивидуальных реакций на одни и те же инфекции или вакцины.

Как правило, распознавание комплекса рМНС является необходимым, но не достаточным стимулом для первичной активации и дифференциации наивных Т-клеток. Вместе с этим происходит взаимодействие между рецептором В7 на поверхности APC и лигандом CD28 на поверхности Т-клетки, что способствует дальнейшей экспрессии генов Т-клеточного ростового фактора — IL-2 и его рецептора. В результате аутокринного действия IL-2 активированные Т-клетки начинают интенсивно пролиферировать [Murphy, Weaver, 2016]. Т-клеточный ответ также модулируется через взаимодействие рецепторов Т-клетки с другими молекулами на поверхности APC. Некоторые из них оказывают ко-стимулирующий эффект и способствуют пролиферации, выполнению эффекторных функций и выживанию Т-клетки. Однако, несмотря на похожие функции разных ко-стимулирующих молекул, их вклад в иммунный ответ может варьировать в зависимости от конкретного патогена [52]. Другой тип взаимодействий – ко-ингибирующий – участвует в подавлении Т-клеточного ответа и необходим для предотвращения развития патологических иммунных реакций [53].

Вскоре после активации Т-клетки начинают пролиферировать. Все потомки одной клетки будут иметь идентичный $\alpha\beta$ TCR и, соответственно, идентичную антигенную специфичность. Совокупность таких Т-лимфоцитов называется клоном, а увеличение их численности – клональной экспансией. Зависимость между исходной численностью клона и интенсивностью его пролиферации можно описать обратным степенным законом: кратность клональной экспансии обратно пропорциональна количеству клеток-предшественников (Рисунок 5). Модель, описывающая эту взаимосвязь, основана прежде всего на доступности комплексов рМНС и конкуренции Т-клеток за взаимодействие с ними [54]. Кроме того, на пролиферацию отдельных клонов может влиять степень родства TCR к рМНС и более высокоаффинные клоны будут подавлять экспансию менее аффинных [55].

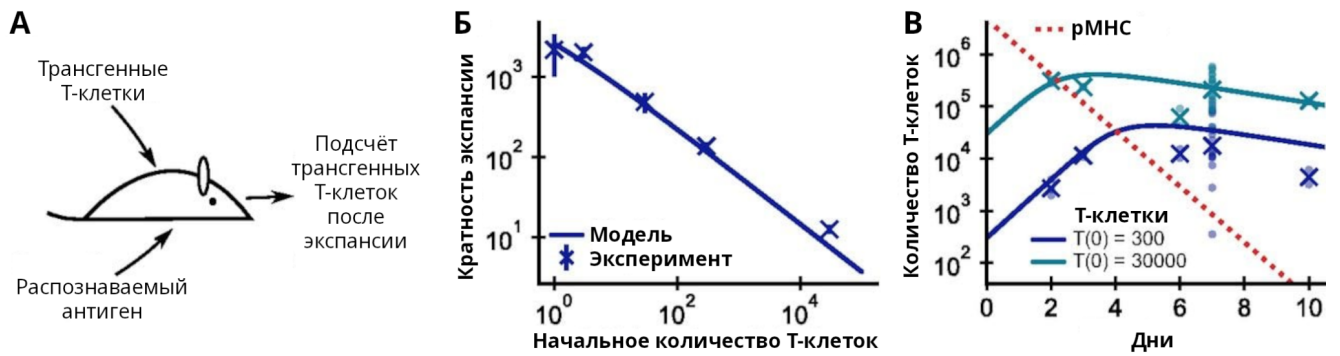


Рисунок 5. Модель клональной экспансии в зависимости от исходной численности клона. **А.** Экспериментальные данные были получены на основе переноса трансгенных Т-клеток с известной специфичностью мышам-реципиентам с последующей стимуляцией [54]. **Б.** Изменение кратность экспансии на день 7 в зависимости от исходной численности клона (сравнение экспериментальных и предсказанных моделью данных). **В.** Динамика изменения клональной численности и количества доступных рМНС со временем (сравнение экспериментальных и предсказанных моделью данных). Указана динамика для 300 и 30 000 исходных трансгенных Т-клеток. Адаптировано из [55].

Вместе с тем после активации в Т-клетке запускаются механизмы дифференциации, в результате которых Т-клетки получают способность к выполнению различных функций. В общем виде $CD4^+$ Т-клетки в дальнейшем выступают в роли “хелперов”, а $CD8^+$ Т-клетки — в роли цитотоксических Т-лимфоцитов (англ. *cytotoxic T lymphocyte*, CTL), но под действием ряда факторов каждая Т-клетка дополнительно приобретают более узкоспециализированный фенотип. Выбор конкретного пути дифференциации является результатом совокупности сигналов, которые Т-клетка получает во время и вскоре после активации, но ключевую роль в этом процессе играют цитокины [56].

Идентифицировано множество субпопуляции $CD4^+$ Т-клеток (T_H1 , T_H2 , T_H9 , T_H17 , T_H22 , T_{FH} , $CD4^+$ T_{Reg} и др.) [57–59], которые участвуют в широком спектре функций иммунной системы. Например, эффекторные T_H1 -клетки способствуют уничтожению внутриклеточных патогенов, T_H2 – играют важную функцию в барьерном иммунитете слизистых оболочек, T_H17 – участвуют в уничтожении некоторых типов грибов и бактерий, а T_{FH} – помогают В-клеткам в зародышевых центрах, обеспечивают выработку антител и переключение изотипов [9]. В противоположность $CD4^+$ Т-клеткам, долгое время считалось, что $CD8^+$ Т-клетки функционируют как единая популяция, но в исследованиях последних лет было обнаружено, что и среди них можно выделить отдельные субпопуляции: T_C1 , T_C2 , T_C9 , T_C17 и $CD8^+$ T_{Reg} . Однако, наиболее изученными являются T_C1 -клетки, которые находят и уничтожают инфицированные вирусом клетки [60]. Также было показано, что как $CD4^+$, так и $CD8^+$

Т-клетки обладают фенотипической пластичностью и могут менять свой фенотип в зависимости от актуальных на данный момент задач [58,60].

Как правило, перечисленные выше субпопуляции идентифицируют по спектру продуцируемых цитокинов, но анализ транскриптома отдельных Т-клеток показал, что данный подход не всегда позволяет однозначно выделить функционально однородные субпопуляции Т-клеток, что может быть связано с их пластичностью и наличием переходных состояний между разными субпопуляциями [61].

2.1.4. Формирование Т-клеточной памяти

Важной особенностью адаптивного иммунитета является образование долгоживущих Т-клеток памяти в результате иммунного ответа. При повторном заражении тем же патогеном благодаря иммунологической памяти очень быстро формируется новый пул эффекторных Т-клеток, который обеспечивает защиту организма.

В зависимости от способности к пролиферации, миграции и выполнению эффекторных функций выделяют несколько основных субпопуляций Т-клеток памяти (Рисунок 6). “Стволовые” Т-клетки памяти (англ. *stem cell-like memory T cells*, T_{SCM}) и Т-клетки центральной памяти (англ. *central memory T cells*, T_{CM}) имеют высокий пролиферативный потенциал и способны напрямую мигрировать из кровяного русла во вторичные лимфоидные органы благодаря наличию С-С-рецептора хемокина 7 (англ. *C-C chemokine receptor type 7*, CCR7) на поверхности клеток. Эффекторные Т-клетки памяти (англ. *effector memory T cells*, T_{EM}) прежде всего мигрируют в периферические ткани (в том числе, в места воспаления) и способны совершить быстрый переход к фенотипу эффекторных Т-клеток и продуцировать широкий спектр цитокинов. Также иногда выделяют “промежуточный” тип клеток памяти (англ. *transitional memory T cells*, T_{TM}), у которых уже отсутствует CCR7, но всё ещё присутствует ко-стимуляторный рецептор CD28. Эффекторные Т-клетки памяти, которые ре-экспрессируют CD45RA (изоформу тирозиновой протеинфосфатазы С рецепторного типа) названы терминально дифференцированными (англ. *terminal effector memory T cells*, T_{TE} или T_{EMRA}). T_{TE} имеют самый низкий пролиферативный потенциал, но способны к немедленному выполнению эффекторных функций. Относительно в стороне находится субпопуляция резидентных Т-клеток памяти (англ. *tissue-resident memory T cells*, T_{RM}), потерявших способность к миграции и осевших в периферических тканях, где они играют важную роль в барьерной защите организма [62,63].

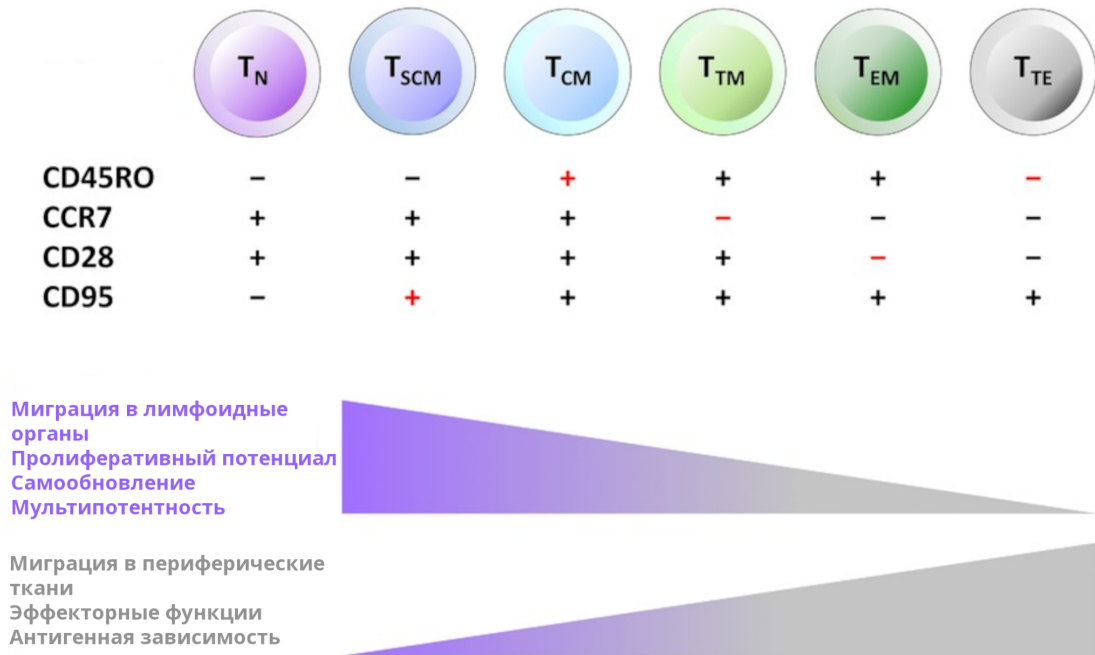


Рисунок 6. Субпопуляции Т-клеток памяти. Экспрессия CD45RO, CCR7, CD28 и CD95 позволяет различить наивные Т-клетки и пять субпопуляций Т-клеток памяти, функции и характеристики которых постепенно меняются от наивных (T_N) до терминально дифференцированных (T_{TE}) Т-клеток. T_{SCM} – “стволовые” Т-клетки памяти, T_{CM} – центральные Т-клетки памяти, T_{TM} – “промежуточные” Т-клетки памяти, T_{EM} – эффекторные Т-клетки памяти. Адаптировано из [62].

К сожалению, до сих пор нет полной ясности в том, как именно происходит формирование различных субпопуляций Т-клеток памяти. Сейчас существуют разные модели, описывающие динамику и последовательность развития эффекторных Т-клеток и Т-клеток памяти из наивных предшественников [63,64]. Тем не менее, однажды возникнув, клоны Т-клеток памяти могут десятилетиями сохраняться в организме и обеспечивать его защиту [65,66].

2.2. Влияние вакцинации на Т-клеточный иммунитет

Главной задачей вакцинации является обучение адаптивного иммунитета, т.е. формирование В- и Т-клеток памяти, специфичных к определённому патогену. За прошедшие десятилетия было разработано множество подходов к созданию вакцин, но уже ставшие классическими инактивированные вакцины до сих пор являются одними из самых распространённых [67,68]. Главными преимуществами инактивированных вакцин являются высокая степень безопасности и хороший профиль переносимости, а также умеренные требования к хранению и транспортировке [69].

Важным показателем качества вакцины является результат теста на иммуногенность, который, как правило, основан на определении уровня антиген-специфических антител [1]. Но так как полная элиминация вируса невозможна без участия Т-клеток [70], эффективность стимуляции Т-клеточного иммунитета также необходимо учитывать при разработке новой или улучшения уже имеющейся вакцины.

2.2.1. Вакцина против гриппа

Противогриппозная инактивированная вакцина значительно уступает в эффективности многим одобренным вакцинам против других инфекций, а для поддержания защитного иммунитета требуется ежегодная ревакцинация [71]. Тем не менее, на данный момент это наиболее эффективный способ борьбы с сезонной эпидемией гриппа [72]. Обычно влиянию вакцины против гриппа на Т-клеточный иммунитет не уделяют много внимания, хотя недостаточная стимуляция Т-клеток может быть одной из причин слабой эффективности вакцины.

В большей степени изучен ответ $CD4^+$ Т-клеток, которые в том числе необходимы для формирования высокоаффинных антител [73]. Uchtenhagen и коллеги продемонстрировали, что после иммунизации инактивированной вакциной против гриппа у доноров увеличивается доля вирус-специфических $CD45RA^-CD4^+$ Т-клеток, многие из которых узнают консервативные эпитопы вируса гриппа А и продолжают экспрессировать маркер активированных Т-клеток (CD38) через 2-3 недели после вакцинации [74]. Также в исследовании по изучению иммуногенных свойств субъединичной вакцины против вируса гриппа А (H5N1) была обнаружена положительная корреляция между кратностью увеличения доли $CD4^+$ Т-клеток, продуцирующих цитокины в ответ на *in vitro* стимуляцию после первой иммунизации, и титром нейтрализующих антител, измеренным после бустерной вакцинации через полгода [75].

В то же время, в ряде работ было показано, что иммунизация инактивированной вакциной против гриппа может повысить уровень продукции цитокинов в ответ на *in vitro* стимуляцию не только для $CD4^+$, но и для $CD8^+$ Т-клеток, однако, полученные данные неоднородны. По результатам одного из первых исследований наблюдаемая сила Т-клеточного ответа была обратно пропорциональна возрасту вакцинированного донора: наибольшее увеличение Т-клеток, продуцирующих $IFN\gamma$, наблюдалось у детей в возрасте от 6 месяцев до 4 лет, в то время как для группы доноров в возрасте от 22 до 48 лет изменения были незначительными (Рисунок 7) [76]. Кроме того, у детей сильнее, чем у взрослых доноров падал уровень экспрессии CD27 (признак дифференциации в эффекторные Т-клетки [77,78]) и увеличивался уровень продукции перфорина $IFN\gamma^+CD8^+$ Т-клетками [79]. В более поздних работах, наоборот, у детей в возрасте от 6 до 35 месяцев, получивших противогриппозную

вакцину, отсутствовали значимые изменения в Т-клеточном ответе [80], в то время как у взрослых доноров (от 18 до 49 лет) наблюдались повышенные уровни продукции $IFN\gamma$ и пролиферации в ответ на *in vitro* стимуляцию после вакцинации [81,82]. В упомянутых выше исследованиях применялись вакцины с разным антигенным составом (в соответствии с сезонными рекомендациями), а также отличались условия стимуляции и способы детекции ответа, что могло повлиять на полученные результаты. Тем не менее, сравнительные исследования доноров разных возрастных групп демонстрируют ослабление Т-клеточного ответа на вакцину против гриппа с возрастом [76,83].

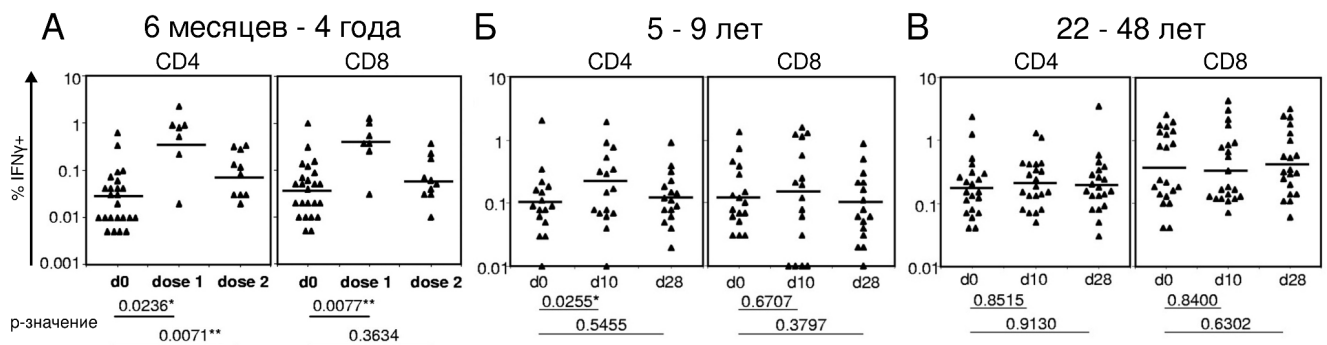


Рисунок 7. Т-клеточный ответ на инактивированную вакцину против гриппа, оцененный по проценту $IFN\gamma^+CD4^+$ и $IFN\gamma^+CD8^+$ Т-клеток после инкубации с нативным вирусом гриппа A virus/Wyoming (H3N2). **А.** Дети в возрасте от 6 месяцев до 4 лет: измерения были выполнены в 0-й день (d0) и на 10-й день после первой (dose 1) или второй (dose 2) вакцинации. **Б.** Дети в возрасте от 5 до 9 лет: измерения были выполнены в 0-й день (d0), 10-й день (d10) и 28-й день (d28) после вакцинации. **В.** Взрослые от 22 до 48 лет: аналогично (Б). Для всех данных было выполнено логарифмическое преобразование. Горизонтальным линиям соответствуют средние геометрические проценты $IFN\gamma^+$ Т-клеток, полученные с помощью регрессионного анализа обобщенных оценочных уравнений. Для оценки статистической значимости был использован обобщенный тест множителей Лагранжа. * – $p < 0,05$ в индивидуальном сравнении, ** – $p < 0,05$ после поправки на множественное тестирование с использованием метода Бонферрони. Адаптировано из [76].

Изменение силы Т-клеточного иммунного ответа на противогриппозную вакцину с возрастом может зависеть от разных факторов. Например, у взрослых более богатая история взаимодействия с антигенами вируса гриппа, чем у детей, поэтому у них уже сформирован большой пул специфичных Т-клеток памяти. В ответ на очередную рестимуляцию иммунный ответ будет развиваться значительно быстрее и так же быстро произойдет нейтрализация и элиминация антигена, в результате чего продолжительность и амплитуда Т-клеточного ответа

могут быть значительно меньше, чем при первой встрече с патогеном. Этот эффект можно наблюдать даже на коротком промежутке времени. Так, было показано, что у доноров, которые в предыдущем сезоне получили вакцину против гриппа, наблюдается более слабый ответ $CD4^+$ Т-клеток в сравнении с донорами, которые не были вакцинированы в предыдущий год [84,85]. Аналогичный эффект снижения силы иммунного ответа при регулярной ревакцинации против гриппа наблюдается и для антител [86,87].

Для людей пожилого возраста, вероятно, более значимым фактором является старение иммунной системы [88]. В частности, в пожилом возрасте Т-клетки начинают хуже отвечать на стимуляцию и выполнять эффекторные функции [89]. Свой вклад вносит и уменьшение разнообразия репертуара ТCR, в котором начинают преобладать Т-клеточные клоны, специфичные к ограниченному числу эпитопов, и сокращается доля клонов наивных Т-клеток, необходимых для формирования защиты против новых штаммов вируса гриппа [90,91]. Кроме того, с возрастом у многих людей развиваются хронические заболевания, которые также негативно сказываются на функционировании иммунной системы и силе ответа на противогриппозную вакцинацию [74,92–94].

2.2.2. Вакцина против клещевого энцефалита

Вакцина против клещевого энцефалита (КЭ) является примером высокоэффективной инактивированной вакцины. В зависимости от производителя, стандартный курс иммунизации состоит из двух или трёх инъекций с интервалом 1-7 месяцев между первыми двумя вакцинациями, но для поддержания высокого уровня защиты рекомендуется последующая ревакцинация каждые три года [95]. Кроме того, всё ещё остаётся риск прорывной инфекции, которая может привести к серьёзным неврологическим осложнениям и даже смерти [5]. К сожалению, на данный момент данные о влиянии вакцины против КЭ на Т-клеточный иммунитет довольно ограничены и более подробное изучение вопроса могло бы помочь в дальнейшем улучшении протокола вакцинации или создании более надёжных вакцин.

Подавляющая часть опубликованных исследований затрагивает функциональные проявления только $CD4^+$ Т-клеток и ставит под сомнение способность инактивированной вакцины против КЭ индуцировать $CD8^+$ Т-клеточный ответ [6–8,96]. Было показано, что после вакцинации увеличивается продукция цитокинов $CD4^+$ Т-клетками в ответ на *in vitro* стимуляцию антигенами вируса КЭ [96,97], при этом среди продуцентов преобладали $TNF\alpha^+IL-2^+CD4^+$ Т-клетки (Рисунок 8) [6,98]. Уровень продукции цитокинов $CD4^+$ Т-клетками напрямую коррелировал с титром нейтрализующих антител, что свидетельствует о значительном вкладе $CD4^+$ Т-клеток в гуморальный ответ на вакцину против КЭ [97,99,100]. Эту роль также подтверждает повышение уровня экспрессии CD154, необходимого для

созревания В-клеток [101], на поверхности цитокин-продуцирующих CD4⁺ Т-клеток после вакцинации [6].

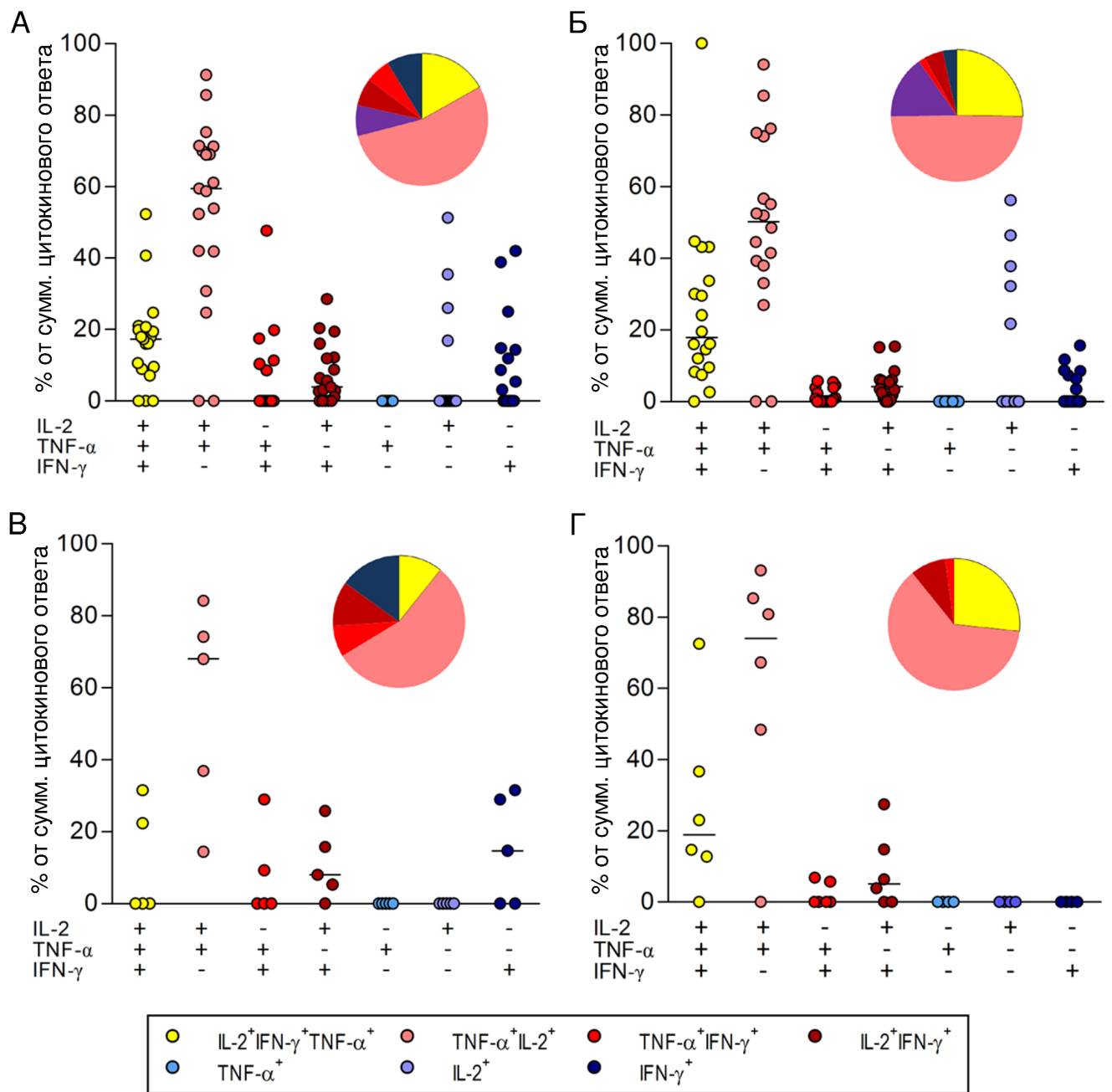


Рисунок 8. Паттерны продукции цитокинов CD4⁺ Т-клетками в ответ на *in vitro* стимуляцию пептидами белка Е (А, Б) и белка С (В, Г) вируса КЭ через неделю после первичной (А, В) и две недели после бустерной (Б, Г) вакцинации. Точки обозначают долю субпопуляции продуцентов от общего числа клеток-продуцентов каждого донора. Чёрные линии соответствуют медианным значениям. Круговые диаграммы содержат усреднённые значения доли каждой субпопуляции от общего числа клеток-продуцентов всех доноров. Адаптировано из [98].

С другой стороны, данные о Т-клеточном ответе на вакцину против КЭ помогли лучше понять особенности иммунного ответа у “нереспондеров” – людей с очень низким или недетектируемым титром нейтрализующих антител (<1:10) после вакцинации. Т-клетки таких доноров не показали увеличения продукции IL-2 и IFN γ в ответ на *in vitro* стимуляцию после бустерной вакцинации, в отличие от доноров с высоким титром нейтрализующих антител (>1:30). При этом у “нереспондеров” после иммунизации увеличилась доля CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T_{Reg}, в то время как у контрольной группы наблюдалось статистически значимое уменьшение [97]. Сокращение доли регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺) через неделю после бустерной вакцинации наблюдалось и в другой работе [96] и, вероятно, является результатом увеличения доли эффекторных Т-лимфоцитов в результате иммунного ответа [102]

Т-клеточные эпитопы вируса КЭ также до сих пор слабо изучены и отсутствуют коммерчески доступные мультимеры, что осложняет выполнение стандартизированного анализа вирус-специфичного Т-клеточного ответа на инфекцию или вакцинацию против КЭ. Большая работа в этой области была проделана Schwaiger и коллегами, которые отобрали наиболее вероятные кандидаты на роль иммунодоминантных эпитопов вируса КЭ для CD4⁺ Т-клеток [99]. В своей работе они анализировали ответ CD4⁺ Т-клеток вакцинированных или заболевших доноров на *in vitro* стимуляцию перекрывающимися пулами или отдельным пептидами трёх структурных белков вируса КЭ (С, рМ/М и Е), которые также представлены в цельновирионной инактивированной вакцине против КЭ [95]. В результате были идентифицированы группы иммунодоминантных пептидов в двух из четырёх α -спиралей белка С и в домене III белка Е (Рисунок 9). При этом специфичность Т-клеточного ответа заболевших доноров оказалась более разнообразной. К сожалению, полученные результаты пока не были изучены в контексте создания мультимеров.

Позднее также были найдены иммунодоминантные эпитопы для CD8⁺ Т-клеток. Обнаруженные пептиды были представлены на HLA-A2 и HLA-B7 и оказались производными неструктурных белков вируса КЭ (NS2a, NS3, NS4b и NS5). Созданные на их основе тетрамеры позволили лучше понять динамику и фенотипические особенности ответа вирус-специфичных CD8⁺ Т-клеток во время инфекции КЭ [103,104]. Однако, цельновирионная инактивированная вакцина не содержит неструктурные белки вируса КЭ (за исключением NS1, ответ на который был обнаружен в нескольких случаях [105,106]), поэтому полученные тетрамеры не подходят для изучения ответа на вакцинацию против КЭ.

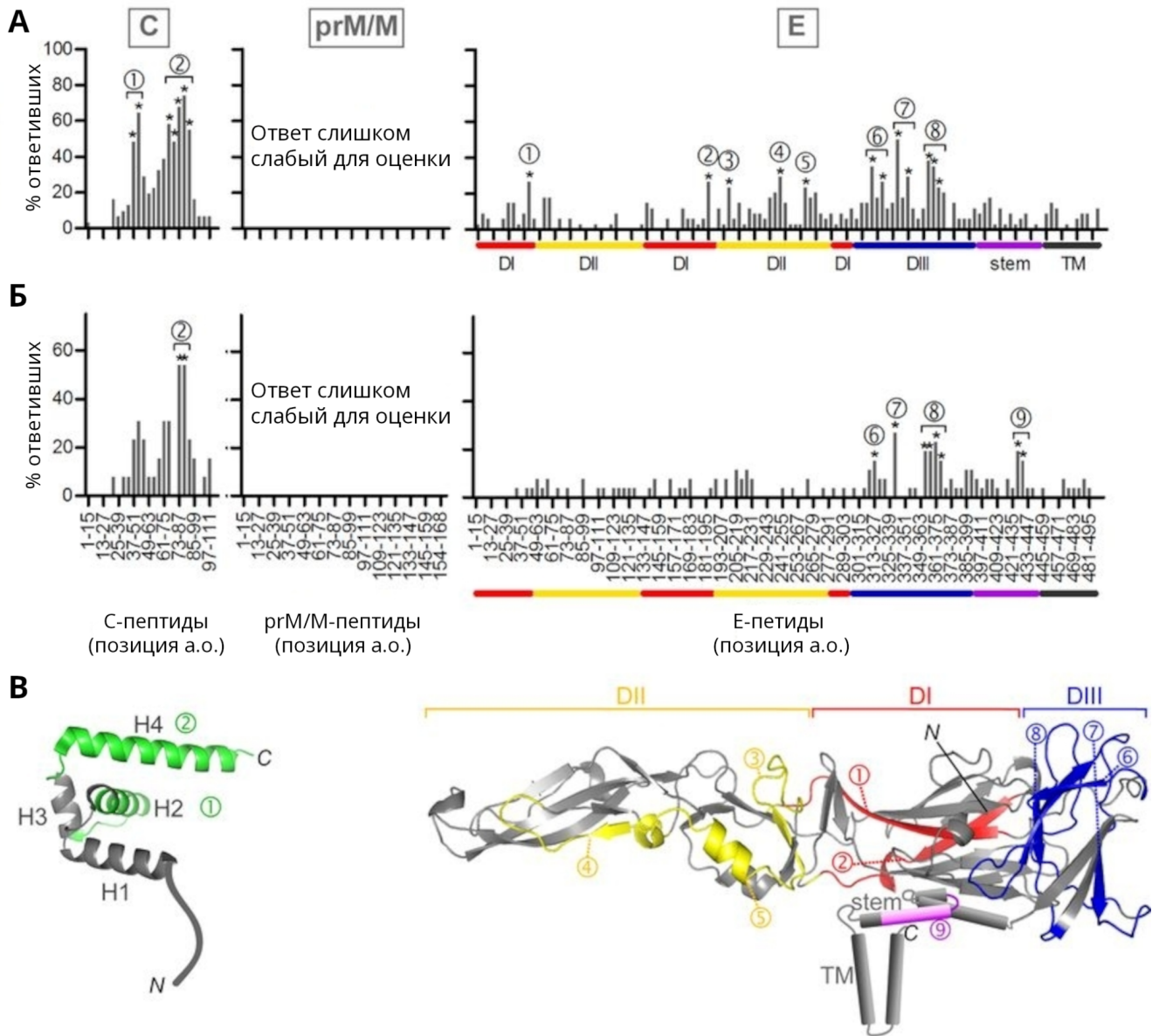


Рисунок 9. Поиск иммунодоминантных пептидов структурных белков С, prM/M и Е вируса КЭ. Процент вакцинированных (**А**) и заболевших (**Б**) доноров с положительным результатом тестирования на отдельные пептиды. Положительным результатом считалось наличие >20 пятен на 1×10^6 CD8⁻ мононуклеарных клеток периферической крови в тесте ELISpot на продукцию IL-2. Пептиды, которые распознаются чаще ($p < 0,05$, точный тест Фишера или критерий хи-квадрат, отдельно для каждого белка и каждой группы доноров) отмечены “*” и объединены в пронумерованные кластеры. **В.** Кристаллографическая структура белков С и Е вируса КЭ [107,108]. Белок С состоит из четырёх α -спиралей (H1-H4), белок Е – из трёх доменов (DI, DII и DIII), стебля и трансмембранного участка. Адаптировано из [99].

2.3. Изучение Т-клеточного ответа с помощью методов высокопроизводительного секвенирования

Существенным недостатком большинства приведённых выше исследований является измерение силы Т-клеточного ответа на основе способности Т-клеток выполнять эффекторные функции в ответ на дополнительную стимуляцию *in vitro*. Таким образом, мы имеем очень косвенное представление о том, как протекает иммунный ответ человека на вакцинацию *in vivo*. С этой точки зрения анализ репертуара TCR является более перспективным подходом для изучения иммунного ответа, так как предоставляет информацию о состоянии организма на момент взятия образца. Однако, это стало возможным только с появлением технологии высокопроизводительного секвенирования (англ. *high-throughput sequencing*, HTS), которая позволила одновременно получать сотни тысяч разных последовательностей TCR из одного образца [14,109,110].

2.3.1. Методы пробоподготовки для HTS

Из трёх наиболее популярных платформ (454 Roche, Illumina и Ion Torrent), разработанных для HTS, Illumina оказалась наиболее конкурентоспособной благодаря высокой производительности и меньшему числу ошибок при чтении гомополимерных последовательностей, и по этим же причинам лучше остальных подходит для секвенирования репертуаров TCR [111].

В то же время, есть большое разнообразие методик пробоподготовки образцов к секвенированию. Для получения нуклеотидных последовательностей TCR в качестве стартового материала можно использовать как геномную ДНК, так и матричную РНК (мРНК) (Рисунок 10). В обоих случаях для обогащения библиотеки целевыми фрагментами необходима амплификация методом ПЦР, основная сложность которой связана с большим разнообразием V- и J-сегментов TCR. Для охвата всех возможных комбинаций и покрытия CDR3 (ключевого фрагмента для идентификации Т-клеточного клона) можно использовать мультиплексный ПЦР со смесью праймеров, специфичных к различным вариантам сегментов [112,113]. Главным недостатком этой стратегии является разная кинетика отжига каждого праймера в смеси, в результате чего возникают искажения в частотах представленности V- и J-сегментов и отдельных клонов в репертуаре [114]. Для того, чтобы нивелировать разницу, было предложено два решения. В первом из них был основан на двухстадийной вложенной ПЦР: сначала проводится несколько раундов амплификации с использованием смеси специфичных к сегментам TCR праймеров с универсальным довеском, а затем – с одной парой праймеров,

специфичных к новым введённым последовательностям [115]. К сожалению, мультиплексный ПЦР на первой стадии всё ещё может быть источником существенных искажений в дальнейшем. В другом варианте авторы работы воссоздали синтетический аналог репертуара для локуса TRG (γ -цепь TCR) и с помощью него подобрали такие концентрации праймеров, при которых эффективность амплификации стала одинаковой для всех комбинаций [116]. С последующей компьютерной обработкой данных секвенирования удалось устранить значительную часть искажений, но такой подход очень трудоёмкий и требует длительной подготовки.

Более успешная стратегия, разработанная для мРНК, предполагает использование только одного праймера, который отжигается на известном фрагменте мРНК (например, консервативном участке С-сегмента TCR) и служит стартом для синтеза комплементарной цепи ДНК (кДНК). Затем к 3'-концу кДНК добавляется универсальная последовательность, которая служит местом отжига для второго праймера в ПЦР, и, таким образом, появляется возможность амплифицировать любую неизвестную нуклеотидную последовательность со стороны 5'-конца от известного участка мРНК. Этот метод получил название 5'-RACE (англ. *rapid amplification of cDNA 5' ends*) [117]. Согласно оригинальной технологии с помощью фермента терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы к 3'-концу добавляют поли(А)-хвост, а затем используют поли(Т)-праймер. Однако, в этом случае в амплификации и дальнейшем секвенировании участвуют ПЦР-продукты любой длины и не все из них будут иметь покрытие, достаточное для определения аллели V-сегмента. Позднее было предложено два способа селективной амплификации только полноразмерных 5'-кДНК: лигирование универсальной последовательности к 5'-концу мРНК ещё до стадии обратной транскрипции [118] или использование способности обратной транскриптазы менять матрицу в процессе синтеза кДНК (технология SMART – от англ. *switching mechanism at 5' end of RNA transcript*) [119,120]. Последний вариант содержит меньше этапов, так как не требует удаления кэп-структуры и лигирования адаптера, однако несёт в себе риски неспецифического отжига SMART-адаптера на С-богатые фрагменты мРНК [121]. В любом случае, дальнейшая амплификация происходит с использованием всего двух праймеров и, таким образом, варибельность V- и J-сегментов не оказывает сильного влияния на конечный продукт ПЦР. При пробоподготовке по технологии 5'-RACE на эффективность ПЦР всё ещё влияют разная длина транскрипта и наличие GC-богатых участков, но их вклад значительно меньше того искажения, которое возникает в результате использования смеси праймеров [122].

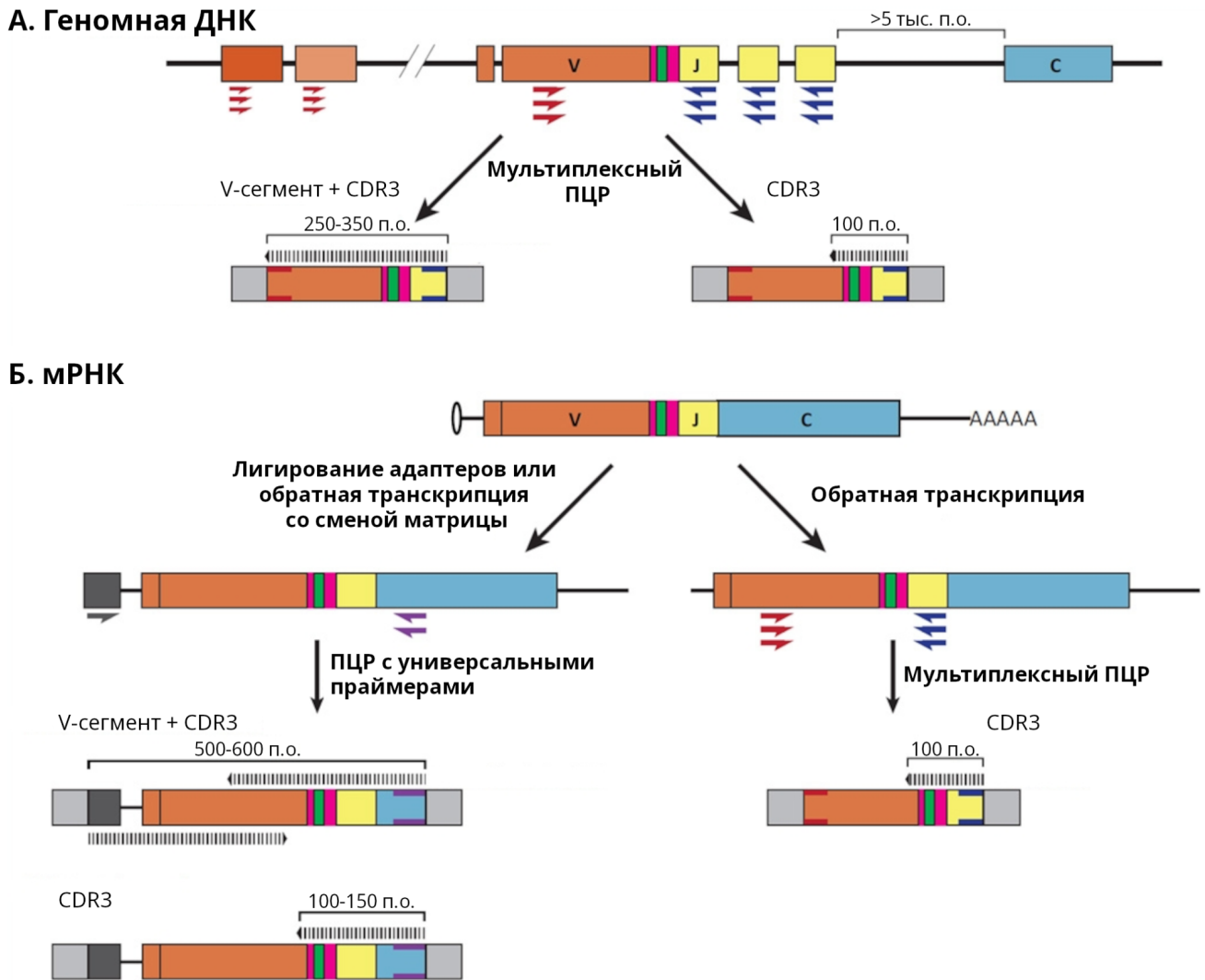


Рисунок 10. Основные стратегии приготовления библиотек для секвенирования TCR. **А.** Пробоподготовка на основе геномной ДНК методом мультиплексной ПЦР со смесью праймеров, специфичных к разным V- и J-сегментам. В зависимости от поставленной задачи дальнейшее секвенирование может покрывать только CDR3 (короткое прочтение), либо CDR3 и значительную часть V-сегмента (длинное прочтение). **Б.** Пробоподготовка на основе мРНК. Может состоять из комбинации обратной транскрипции и мультиплексного ПЦР, либо 5'-RACE с лигированием адаптера или сменой матрицы. Секвенирование также может быть нацелено только на CDR3 (короткое прочтение), либо на CDR3 с полноразмерным V-сегментом (длинное прочтение с двух сторон). Адаптировано из [123].

2.3.2. Биоинформатическая обработка данных секвенирования

Во время ПЦР и секвенирования могут возникать ошибки, связанные с неточностью работы ДНК-полимераз. Такие однонуклеотидные замены или инделы в CDR3 могут привести к искусственному увеличению разнообразия репертуара TCR и ошибкам в интерпретации

результатов исследования. Решить эту проблему удалось с помощью введения дополнительных уникальных молекулярных идентификаторов (англ. *unique molecular identifiers*, UMIs) на этапе синтеза кДНК, которые затем обозначают все нуклеотидные последовательности, полученные от одной мРНК [124]. В дальнейшем были разработаны алгоритмы, которые используя UMIs могут находить и исправлять ошибки в секвенированных последовательностях, в том числе возникшие на стыке V(D)J-сегментов [111,125].

Вместе с тем, основной целью первичной обработки данных секвенирования Т-клеточных рецепторов является реконструкция их репертуара – совокупности вариантов TCR и количественной оценки представленности каждого клона в анализируемом образце. Для этого было разработано множество биоинформатических инструментов, которые определяют аллели V-, D- и J-сегментов, идентифицируют CDR3, проверяют функциональность рецептора (отсутствие стоп-кодонов или сдвига рамки считывания) и подсчитывают количество идентичных нуклеотидных последовательностей для каждого TCR [126–131].

Количество идентичных последовательностей можно интерпретировать как частоту встречаемости клона в исследуемом образце, хотя в случае использования мРНК в качестве стартовой матрицы различия в уровне экспрессии могут исказить оценку клональной численности [132,133]. Тем не менее, на образцах с небольшим количеством Т-клеток и разным фенотипическим составом было показано, что по технологии 5'-RACE+SMART в итоговой библиотеке среднем оказывается от 0,5 до 1,7 кДНК β-цепи TCR на Т-клетку [134]. Также данные в пользу того, что наблюдаемые частоты секвенированных TCR действительно отражают распределение численности клонов были продемонстрированы и для образцов, приготовленных по технологии 5'-RACE с лигированием UMIs-содержащих адаптеров [135]. Позднее другая группа исследователей на примере наивных Т-клеток обнаружила, что в результате синтеза кДНК по технологии 5'-RACE с лигированием в итоговую библиотеку действительно могут попадать несколько молекул мРНК из одной Т-клетки, но процент таких событий не превысил 2,2 для α-цепи TCR и 4,8 для β-цепи TCR, и оказался недостаточным для того, чтобы объяснить наблюдаемую разницу в частотах встречаемости отдельных клонов [136].

2.3.3. Стратегии анализа репертуаров TCR и их применение в изучении Т-клеточного ответа на вакцинацию

Иммунный ответ на вакцинацию является динамическим процессом, параметры которого меняются со временем, поэтому в основе большинства исследований лежит сравнение состояний до и после иммунизации. Для репертуаров TCR сравнение может быть основано на общих характеристиках (разнообразие и распределение частот клонов или сегментов) или

индивидуальных свойствах каждого клона (физико-химические свойства CDR3 и вероятность сборки конкретного TCR).

Разнообразие и структура репертуара TCR могут отражать иммунный статус человека и меняться под влиянием клональной экспансии или в результате развивающейся патологии. Например, в результате иммунизации рекомбинантной вакциной против гепатита В было отмечено увеличение разнообразия репертуара β -цепей TCR [137]. С другой стороны, с возрастом [90,91] и при аутоиммунных заболеваниях [138], наоборот, наблюдается уменьшение разнообразия и преобладание высокопредставленных клонов. Наиболее популярными метриками для оценки общих изменений в репертуаре являются индекс энтропии Шеннона [139] и индекс разнообразия Джини-Симпсона [140], но с развитием методов машинного обучения появились и более сложные подходы к комплексной оценке репертуара TCR, основанной на нуклеотидной последовательности CDR3 и частотах использования V-, D- и J-сегментов [141,142]. К сожалению, применение обобщённых оценок не позволяет понять механизмы, лежащие в основе наблюдаемых изменений.

Статистические методы, направленные на поиск ярко выраженных изменений в частотах представленности отдельных клонов, оказались более успешными в детекции вакцин-индуцированной клональной экспансии. Впервые такой подход был использован DeWitt и коллегами [143]. В результате сравнения репертуаров β -цепей TCR тотальной фракции Т-клеток и активированных эффекторных $CD8^+$ Т-клеток ($CD14^-CD19^-CD38^+HLA-DR^+$), полученных после иммунизации вакциной против жёлтой лихорадки, им удалось обнаружить для каждого донора около 2000 $CD8^+$ Т-клеточный клонов, ассоциированных с ответом на вакцинацию, из которых более 5% в дальнейшем присутствовало в репертуаре популяций Т-клеток памяти. Позднее на примере той же вакцины был предложен другой алгоритм сравнения тотальных репертуаров Т-клеток периферической крови, использующий инструментарий для анализа дифференциальной экспрессии генов (edgeR) [144]. С его помощью авторы выявили сотни вакцин-ассоциированных клонов для каждого донора и подтвердили корректность алгоритма независимыми методами [145]. Кроме того, благодаря репертуарам TCR, полученным в разные моменты времени и из разных фенотипических фракций, стало возможно отследить динамику фенотипические изменения клеток найденных вакцин-ассоциированных клонов.

Помимо этого, исследователи продолжают использовать и более классические способы идентификации вакцин-ассоциированных клонов, определяя TCR вирус-специфичных или активированных Т-клеток [145–147]. Подобные работы легли в основу нескольких баз данных, содержащих уникальную информацию о TCR и их специфичности [148,149], а также сделали возможным поиск новых вакцин-ассоциированных клонов с гомологичным TCR.

В свою очередь, были разработаны и разные методы для анализа сходства аминокислотных последовательностей TCR. Один из самых простых подходов – прямое сравнение аминокислотных последовательностей CDR3 и определение количества замен между ними (расстояние Хэмминга или Левенштейна). Более сложный алгоритм TCRdist учитывает сходство всех участвующих во взаимодействии с комплексом pMHC участков TCR (CDR1, CDR2, CDR3), а также физико-химическое сходство аминокислот (взвешенное расстояние Хэмминга) [150,151]. Также на основе накопленных данных о расположении и взаимодействии аминокислот в кристаллических структурах TCR–pMHC был разработан алгоритм GLIPH, который выделяет группы похожих по специфичности TCR с учётом предсказания ключевых во взаимодействии с эпитопом аминокислот CDR3 [152,153].

Вышеописанные алгоритмы объединяют похожие TCR в кластеры, но без дополнительных данных о специфичности не способны выделить кластер вакцин-ассоциированных клонов среди прочих похожих последовательностей. Для решения этой проблемы был разработан алгоритм ALICE, который сравнивает данные о представленности клонов в репертуаре TCR с вероятностью сборки этих же аминокислотных последовательностей в результате рекомбинации на этапе созревания TCR и, таким образом, может идентифицировать группы клонов, подвергшихся конвергентной селекции, а сравнение результатов анализа репертуаров до и после вакцинации позволяет выявить вакцин-ассоциированные группы клонов [154]. По кластерам, которые формируют вакцин-ассоциированные клоны, также можно сделать предположения о свойствах Т-клеточного ответа, количестве иммунодоминантных эпитопов и особенностях взаимодействия похожих TCR с антигенами вакцины [145,155].

3. Материалы и методы

3.1. Доноры и сбор образцов

В исследованиях участвовали здоровые доноры. Один донор (мужчина) в возрасте 58 лет трижды получил сезонную субъединичную инактивированную вакцину против гриппа (Influvac®, 0,5 мл, Abbott Biologicals B.V., Нидерланды) в 2014, 2015 и 2016 годах. Все три вакцины содержали антигены вируса, подобного штамму A/California/7/2009(H1N1)pdm09. Группа из 11 доноров (7 женщин и 4 мужчины) в возрасте от 24 до 60 лет (медиана 27 лет, Q1=25 – Q3=32) получила по две дозы инактивированной вакцины против КЭ (Клещ-Э-Вак®, 0,5 мл, ФГУП ПИПВЭ им. М.П. Чумакова РАМН, Россия) с интервалом в 1 месяц, согласно одобренному протоколу иммунизации. Вакцинация против клещевого энцефалита была выполнена в 2016–2018 гг. Для 10 доноров, вакцинированных против КЭ, отсутствуют данные о ранее перенесённой инфекции или вакцинации против КЭ, но один донор (#9) прошёл полный курс вакцинации за 10 лет до начала исследования.

Сбор образцов периферической венозной крови (от 9 до 72 мл) был проведён в условиях сертифицированной диагностической лаборатории. Образцы крови для выделения мононуклеарных клеток периферической крови (англ. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) были собраны в пробирки с ЭДТА (VACUETTE® К3Е К3EDТА, Greiner Bio-One, Австрия). Образцы для выделения сыворотки были собраны в специально предназначенные для этого пробирки (VACUETTE® CAT serum separator clot activator tubes, Greiner Bio-One, Австрия).

3.2. Определение концентрации IgG, специфичных к вирусу КЭ, в сыворотке крови

Пробирки с венозной кровью, предназначенные для выделения сыворотки, были оставлены в вертикальном положении на 1,5 часа при RT. После инкубации выполнили центрифугирование при 1500g RT 10 мин. и перенесли супернатант (сыворотку) в пробирки объёмом 1,5 мл. Определение концентрации IgG, специфичных к вирусу КЭ, было проведено методом иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью набора ВектоВКЭ-IgG (Вектор-Бест, Россия). В лунки 96-луночного планшета с иммобилизованным антигеном вируса КЭ вносили калибровочные образцы, образцы с положительным и отрицательным контролями, а также разведённые образцы сыворотки крови в двух повторностях. Разведение образцов сыворотки

было выполнено в 2 этапа: сначала в 2 или 3 раза, затем ещё в 10 раз. Далее инкубировали планшет при 37°C 60 мин и промыли содержимое лунок промывочным раствором 5 раз. В каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата антител к IgG человека, меченных пероксидазой хрена. Повторили инкубацию при 37°C 60 мин и промывку лунок. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл ТМБ (тетраметилбензидина, субстрата пероксидазы) и инкубировали в тёмном месте при RT 25 мин. По окончании инкубации внесли по 100 мкл стоп-реагента и измерили оптическую плотность растворов в лунках на микропланшетном фотометре GENios Pro (Tecan, Швейцария) в двух-волновом режиме 450/620 нм. Концентрацию IgG определяли по калибровочному графику, построенному на основе измерений образцов с известной концентрацией.

3.3. Выделение PBMCs методом градиентного центрифугирования

Венозная кровь была разбавлена в 4 раза фосфатно-солевым буферным раствором Дульбекко (DPBS, ПанЭко, Россия). Полученный раствор наслаивали на 7 или 15 мл фиколла (ПанЭко, Россия) комнатной температуры и центрифугировали при 400g 20°C 30 мин. После центрифугирования отобрали интерфазу (PBMCs) в отдельные пробирки и дважды промыли с буфером DPBS, каждый раз центрифугируя при 450g 20°C 15 мин. и отбирая супернатант. Образцы, предназначенные для получения нуклеотидных последовательностей β -цепей TCR тотальной фракции PBMCs, были перенесены в пробирку объёмом 1,5 мл и ресуспендированы в 1 мл TRIzol (Invitrogen, США). Остальные были перенесены на лёд для дальнейшего выделения субпопуляций Т-клеток или стимуляции.

3.4. Выделение CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток

Выделение CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток было выполнено с помощью набора для позитивной селекции на магнитных частицах Dynabeads (CD4 and CD8 Dynabeads Positive Isolation Kit, Invitrogen, США). К PBMCs добавили 1-2 мл холодного буфера “Dynabeads” (1x PBS, 0.1% BSA, 2 mM EDTA, pH 7,4) и провели центрифугирование при 450g 4°C 5 мин. Отобрали супернатант и ресуспендировали осадок в 1 мл буфера “Dynabeads”. Ресуспендированные клетки перенесли в пробирку объёмом 1,5 мл с 50 мкл анти-CD4 Dynabeads и инкубировали в ротаторе при 5 rpm 4°C 30 мин. После инкубации перенесли пробирку на магнит и оставили на 5 минут. Супернатант перенесли в пробирку объёмом 1,5 мл с 50 мкл анти-CD8 Dynabeads и инкубировали при тех же условиях. Оставшийся частицы анти-CD4 Dynabeads

ресуспендировали в 1 мл холодного буфера “Dynabeads” и снова вернули пробирку на магнит на 30 сек. Затем отобрали супернатант и повторили промывку. К полученной фракции добавили 1 мл TRIzol. Аналогичным образом промыли образец после инкубации с анти-CD8 Dynabeads и смешали с 1 мл TRIzol.

3.5. Выделение “non-naïve” Т-клеток

Для изучения влияния противогриппозной вакцинации были выделены “non-naïve” Т-клетки с помощью набора для изоляции наивных CD8⁺ Т-клеток человека (Naïve CD8⁺ T Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec, США) с использованием только первых двух компонентов для деплеции не-наивных Т-клеток (CD45RO⁺, CD56⁺, CD57⁺ и CD244⁺). К PBMCs добавили 1-2 мл холодного буфера “Miltenyi” (1x PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA, pH 7,2) и провели центрифугирование при 450g 4°C 5 мин. Отобрали супернатант и ресуспендировали осадок в 40 мкл буфера “Miltenyi”. К клеткам добавили 10 мкл биотинилированного коктейля антител, ресуспендировали и инкубировали при 4°C 10 мин. Затем добавили 30 мкл буфера “Miltenyi” и 20 мкл анти-биотиновых MicroBeads, ресуспендировали и инкубировали при 4°C 15 мин. После инкубации добавили к клеткам 1 мл буфера “Miltenyi” и провели центрифугирование при 300g 4°C 10 мин. Отобрали супернатант и ресуспендировали клетки в 500 мкл буфера “Miltenyi”. Суспензию клеток нанесли на предварительно подготовленную и помещённую в магнит колонку MS (Miltenyi Biotec, США), затем последовательно трижды добавили по 500 мкл буфера “Miltenyi”, каждый раз дожидаясь опустошения резервуара колонки. После промывки перенесли колонку в чистую пробирку, добавили 1 мл буфера “Miltenyi”, вставили поршень в колонку и нажали на него. Полученную фракцию “non-naïve” Т-клеток осадили с помощью центрифугирования при 300g 4°C 15 мин. Отобрали супернатант и смешали осадок с 1 мл TRIzol.

3.6. Выделение CD45RO⁺ Т-клеток

Для изучения влияния вакцины против КЭ были выделены CD45RO⁺ Т-клетки с помощью антител, конъюгированных с магнитными частицами CD45RO MicroBeads (Miltenyi Biotec, США). К PBMCs добавили 1-2 мл холодного буфера “Miltenyi” и провели центрифугирование при 450g 4°C 5 мин. Отобрали супернатант и ресуспендировали осадок в 100 мкл буфера “Miltenyi”. К клеткам добавили 20 мкл CD45RO MicroBeads, ресуспендировали и инкубировали при 4°C 15 мин. После инкубации добавили к клеткам 1 мл буфера “Miltenyi” и провели центрифугирование при 300g 4°C 10 мин. Отобрали супернатант и ресуспендировали

клетки в 500 мкл буфера “Miltenyi”. Суспензию клеток нанесли на предварительно подготовленную и помещённую в магнит колонку MS (Miltenyi Biotec, США), затем последовательно трижды добавили по 500 мкл буфера “Miltenyi”, каждый раз дожидаясь опустошения резервуара колонки. После промывки перенесли колонку в чистую пробирку, добавили 1 мл буфера “Miltenyi”, вставили поршень в колонку и нажали на него. Полученную фракцию CD45RO⁺ Т-клеток осадили с помощью центрифугирования при 450g 4°C 5 мин. Отобрали супернатант и смешали осадок с 1 мл TRIzol.

3.7. Стимуляция PBMCs *in vitro* и выделение активированных Т-клеток

Выделенные PBMCs были разбавлены до концентрации 1×10^7 клеток/мл в среде RPMI 1640 GlutaMAX Supplement (Gibco, США) с 5% аутологичной сывороткой, выделенной по протоколу, описанному в разделе 3.2. Далее клеточная суспензия была перенесена в шесть лунок 24-луночного планшета (по 1 мл на лунку). Для стимуляции в каждую лунку был добавлен препарат инактивированных очищенных частиц вируса КЭ, штамм Sofjin [156] в концентрации 10 мкг/мл, эквивалентной концентрации белка Е, измеренного с помощью набора ВектоВКЭ-антиген (Вектор-Бест, Россия). Стимулированные клетки инкубировали в течение 16 или 24 часов при 37°C и 5-7% CO₂.

Через 16 часов инкубации половину клеток (три лунки) отобрали для определения продуцентов IFN γ с помощью набора IFN γ Secretion Assay (Miltenyi Biotec, США). Суспензию клеток перенесли в три круглодонные пробирки объёмом 14 мл, несколько раз промыв лунки холодным буфером “Miltenyi”. В каждую пробирку добавили буфер “Miltenyi” до ~10 мл и провели центрифугирование при 300g 4°C 10 мин. Отобрали супернатант и ресуспендировали осадок в 80 мкл буфера “Miltenyi”. К клеткам добавили по 20 мкл IFN γ Catch Reagent, ресуспендировали и инкубировали на льду в течение 5 мин. Затем добавили по 10 мл тёплой (37°C) среды и инкубировали в ротаторе при 5 rpm 37°C 45 мин. После инкубации сразу переместили клетки на лёд. Долили холодный буфер “Miltenyi” до 14 мл и провели центрифугирование при 300g 4°C 10 мин. Отобрали супернатант и ресуспендировали осадок в 80 мкл буфера “Miltenyi”. К клеткам добавили по 20 мкл IFN γ Detection Antibody (PE), а также анти-CD3-eFluor450 (eBioscience, США) из расчёта 2 мкл на 100 мл клеточной суспензии, соответственно. Клетки ресуспендировали и инкубировали на льду в течение 10 мин. После добавили немного холодного буфера “Miltenyi” и объединили клетки в одну пробирку, тщательно промыв оставшиеся две пробирки. Долили буфер “Miltenyi” до 10 мл и провели центрифугирование при 300g 4°C 10 мин. Отобрали супернатант и ресуспендировали клетки в

350 мкл 1x PBS. Подготовленные клетки были использованы для выделения $CD3^+IFN\gamma^+$ клеток методом флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (Рисунок 11А) на приборе Sony SH800S (Sony Biotechnology, США).

Через 24 часа после начала инкубации оставшиеся клетки (3 лунки) были использованы для окрашивания анти-CD137-PE антителами (Miltenyi Biotec, США). Суспензию клеток перенесли в круглодонную пробирку объемом 14 мл, несколько раз промыв лунки холодным буфером “Miltenyi”. В пробирку добавили буфер “Miltenyi” до ~10 мл и провели центрифугирование при 300g 4°C 10 мин. Полностью отобрали супернатант, ресуспендировали клетки в 300 мкл буфера “Miltenyi” и добавили 1,5 мкл анти-CD137-PE и 6 мкл анти-CD3-eFluor450 антител. Клетки инкубировали на льду и в темноте в течение 30 мин., затем дважды отмыли с 2 мл буфера “Miltenyi” и ресуспендировали в 350 мкл 1x PBS. Подготовленные клетки были использованы для выделения $CD3^+CD137^+$ клеток методом флуоресцентно-активированного клеточного сортирования (Рисунок 11Б) на приборе Sony SH800S (Sony Biotechnology, США).

Сортированные клетки были собраны в 100 мкл буфера RLT (Qiagen, Нидерланды), а затем ресуспендированы с 5x объемом TRIzol.

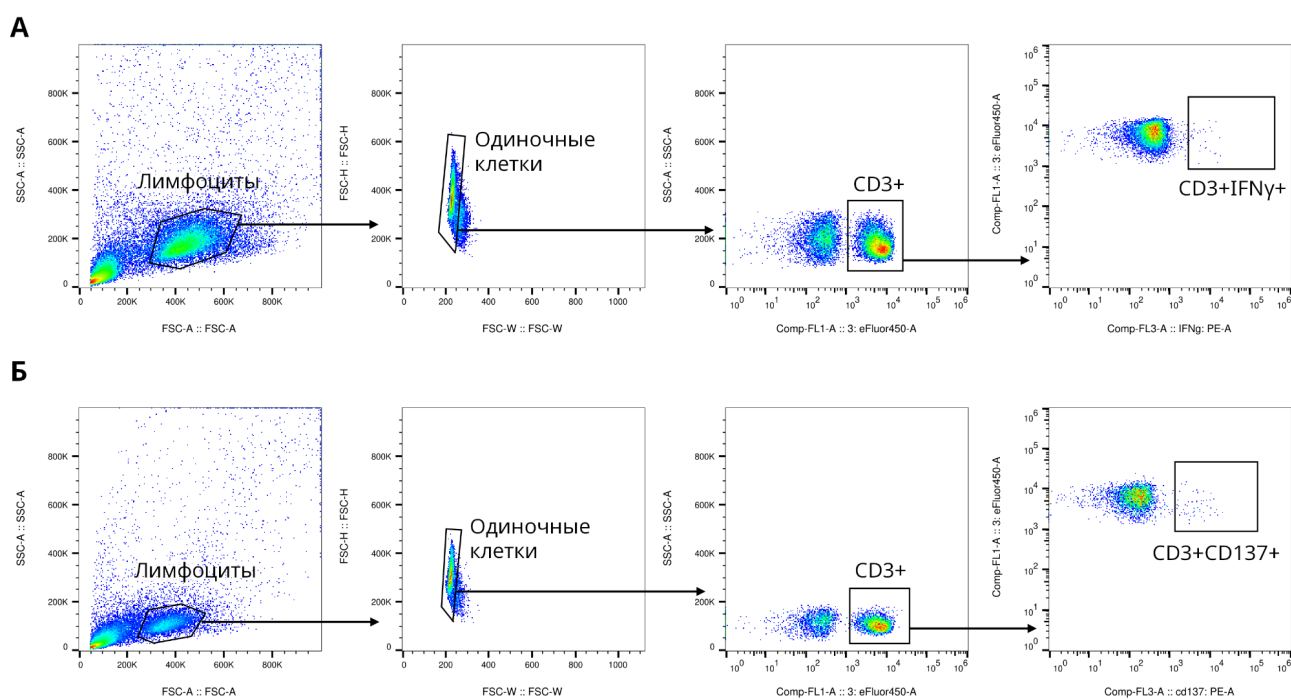


Рисунок 11. Стратегия гейтирования для выделения $CD3^+IFN\gamma^+$ (А) и $CD3^+CD137^+$ (Б) клеток методом флуоресцентно-активированного клеточного сортирования.

3.8. Выделение РНК из образцов лизированных клеток.

К клеткам, ресуспендированным в TRIzol, добавили по 0,2 мл хлороформа на 1 мл TRIzol, встряхивали в течение 15 мин. и инкубировали при RT 2-3 мин. Затем провели центрифугирование при 12000g 4°C 15 мин. и отобрали водную фазу в отдельные пробирки с 0,7 мкл соосадителя Satellite Red (Евроген, Россия). К водной фазе добавили 0,5 мл изопропилового спирта на 1 мл исходного объёма TRIzol, перемешали интенсивным встряхиванием и инкубировали при RT на 10 мин. Затем провели центрифугирование при 12000g 4°C 15 мин, отобрали супернатант. Осадок РНК дважды промыли 80% этанолом и сушили при 45°C 5 мин. Сухой осадок растворили в 10-20 мкл очищенной воды и прогрели при 55°C 5 мин. Перемешали пипетированием и отобрали 1 мкл для измерения концентрации с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, США) и проведения электрофореза в 1%-агарозном геле при 127В в течение 35 мин.

3.9. Получение библиотек кДНК β -цепей TCR РВМСs и больших субпопуляций Т-клеток

Синтез кДНК

Синтез первых цепей кДНК проводили с помощью набора SMARTer (Clontech, США) с добавлением смеси дезоксирибонуклеотидов dNTPs (Евроген, Россия), а также универсального праймера BCuniR4vvshort, комплементарного к консервативной последовательности С-сегмента β -цепи TCR, и олигонуклеотида SMART-Mk-XXX, необходимого для введения универсальной последовательности на 3'-конце кДНК за счёт эффекта смены матрицы (Приложение А). Каждый SMART-Mk-XXX содержал UMIs, состоящий из известного образец-специфичного индекса и шести случайных нуклеотидов с обеих сторон от него. Подобное строение UMIs позволяет одновременно секвенировать большое количество образцов, а также отличать прочтения, полученные от разных молекул РНК с идентичной нуклеотидной последовательностью.

Каждая реакционная смесь для синтеза кДНК содержала:

- 5x буфер SMARTScribe, 2 мкл;
- DTT, 1 мкл;
- Ревертазу SMARTScribe, 1 мкл;
- dNTPs, 10 mM каждого, 1 мкл;
- SMART-Mk-XXX, 10 пкМ, 1 мкл;

- BCuR4vvshort, 10 пкМ, 1 мкл;
- Выделенную РНК, 3 мкл (но не более 500 нг на реакцию).

Полученную смесь вносили в пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл, сверху наслаивали 40 мкл минерального масла. Пробирки помещали в термоциклер и инкубировали при 42°C в течение 1,5 часов.

Для разрушения SMART-адаптера в каждую пробирку под слой масла были добавлены фермент урацил-ДНК-гликозилаза (UDG, New England Biolabs, США) и очищенная вода: из расчёта 0,7 мкл UDG и 20 мкл воды на реакцию. Реакционную смесь перемешали пипетированием и инкубировали при 37°C 1 час.

Затем кДНК была очищена с использованием набора для выделения ДНК из реакционных смесей (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Нидерланды) в соответствии с протоколом производителя. Итоговый объём элюции составил 80 мкл.

Амплификация кДНК

Дальнейшая амплификация проходила в два этапа. На первом этапе ПЦР были использованы прямой праймер Sm1msq и два обратных праймера RP-bcj1 и RP-bcj2, которые являются вложенными относительно праймера BCuniR4vvshort (Приложение А). И прямой и обратный праймеры содержали дополнительные последовательности на 5'-концах – участки отжига праймеров следующего этапа ПЦР.

Каждая реакционная смесь первой ПЦР содержала:

- 5x буфер Q5 (New England Biolabs, США), 3 мкл;
- dNTPs, 10 mM каждого, 0,2 мкл;
- Sm1msq, 10 пкМ, 0,5 мкл;
- Смесь RP-bcj1 и RP-bcj2, 5 пкМ каждого, 0,5 мкл;
- Полимеразу Q5 (New England Biolabs, США), 0,5;
- Очищенную кДНК, 5-10 мкл;
- Очищенную воду, до 15 мкл итоговой реакционной смеси.

Полученную смесь вносили в пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл и амплифицировали в термоциклере в соответствии со следующей программой: 94°C – 20 сек., 60°C – 15 сек., 72°C – 60 сек., 16 циклов. После окончания реакции ПЦР-продукт очищали с помощью набора

QIAquick PCR Purification Kit в соответствии с протоколом производителя. Итоговый объем элюции составил 60 мкл.

В ходе второго этапа амплификации были использованы праймеры Sm-out-msq и П-bcj-YY, с помощью второго – в ПЦР-продукт были введены вторые индексы (Приложение А). Также оба праймера содержали последовательности олигонуклеотидов, необходимые для последующего секвенирования по технологии Illumina.

Каждая реакционная смесь второй ПЦР содержала:

- 5x буфер Q5 (New England Biolabs, США), 5 мкл;
- dNTPs, 10 mM каждого, 0,3 мкл;
- Sm-out-msq, 5 пкМ, 1 мкл;
- П-bcj-YY, 5 пкМ, 1 мкл;
- Полимеразу Q5 (New England Biolabs, США), 0,25;
- Очищенный продукт ПЦР 1, 1-3 мкл;
- Очищенную воду, до 25 мкл итоговой реакционной смеси.

Полученную смесь вносили в пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл и амплифицировали в термоциклере в соответствии со следующей программой: 94°C – 20 сек., 60°C – 20 сек., 72°C – 40 сек., 9-15 циклов. После окончания реакции ПЦР-продукт очищали с помощью магнитных частиц AMPure XP (Beckman Coulter, США) в соотношении 1:0,8 по объему.

Концентрацию готовых очищенных библиотек измеряли с помощью набора для измерения концентрации двухцепочечной ДНК (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, США) на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Затем библиотеки были секвенированы на платформах Illumina HiSeq (длина чтения 2×100 нт) и Illumina NovaSeq (длина чтения 2×150 нт). Полный перечень библиотек с указанием платформ и количеством полученных прочтений приведен в Приложении Б.

3.10. Получение библиотек кДНК β -цепей TCR *in vitro* стимулированных Т-клеток

Синтез кДНК

Для синтеза первых цепей кДНК была использована $\frac{1}{2}$ РНК, выделенной из лизированных клеток. Для защиты от деградации небольшого количества РНК в каждую

реакцию был добавлен ингибитор РНКаз RNasin (Promega, США). Синтез проводили с помощью набора SuperScript III (Invitrogen, США) с добавлением смеси dNTPs (Евроген, Россия), а также универсального праймера BCuniR4vvshort, комплементарного к консервативной последовательности С-сегмента β-цепи TCR (Приложение А).

Каждая реакционная смесь для синтеза кДНК содержала:

- 5x буфер SuperScript III, 2 мкл;
- DTT, 0,5 мкл;
- Ревертазу SuperScript III, 0,5 мкл;
- RNasin, 1 мкл;
- dNTPs, 10 mM каждого, 1 мкл;
- BCuR4vvshort, 10 пкМ, 1 мкл;
- 1/3 выделенной РНК, 3 мкл;
- Очищенную воду, 1 мкл.

Полученную смесь вносили в пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл, сверху наслаивали 40 мкл минерального масла. Пробирки помещали в термоциклер и инкубировали при 42°C в течение 1 часа. Затем кДНК была очищена с использованием магнитных частиц AMPure XP в соотношении 1:1, объем элюции составил 10 мкл.

Аmplификация кДНК

Дальнейшая амплификация проходила в два этапа. На первом этапе был применён метод мультиплексной ПЦР: для амплификации были использованы праймер NxtTRBC, специфичный к С-сегменту (Приложение А), и смесь праймеров, специфичных к различным вариантам V-сегментов (V-mix), из набора для получения библиотек TCR на основе ДНК-матрицы (HUMAN TCR DNA MULTIPLEX KIT, MiLaboratories, США). Все праймеры содержали дополнительные последовательности на 5'-концах – участки отжига праймеров следующего этапа ПЦР.

Каждая реакционная смесь мультиплексной ПЦР содержала:

- 10x Taq Turbo буфер (Евроген, Россия), 2,5 мкл;
- dNTPs, 10 mM каждого (Евроген, Россия), 0,5 мкл;
- NxtTRBC 10 пкМ + V-mix, 2,5 мкл;
- Полимеразу HS Taq (Евроген, Россия), 1,2 мкл;
- Очищенную кДНК, 10 мкл;

- Очищенную воду, 8,3 мкл.

Полученную смесь вносили в пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл и амплифицировали в термоциклере в соответствии со следующей программой: 94°C – 15 сек., 66°C – 1 сек., 57°C – 60 сек., 72°C – 60 сек., 8 циклов, затем 94°C – 15 сек., 74°C – 60 сек., 17 циклов. После окончания реакции ПЦР-продукт очищали с использованием магнитных частиц AMPure XP в соотношении 1:1, объем элюции составил 10 мкл.

В ходе второго этапа амплификации к обоим концам ПЦР-продукта были добавлены адаптеры, необходимые для последующего секвенирования по технологии Illumina, и индексы Nextera N7XX и Nextera S5XX (Nextera XT Index Kit v2, Illumina, США).

Каждая реакционная смесь второй ПЦР содержала:

- 10x Taq Turbo буфер (Евроген, Россия), 2,5 мкл;
- dNTPs, 10 mM каждого (Евроген, Россия), 0,5 мкл;
- Nextera N7XX, 5 мкМ, 1 мкл;
- Nextera S5XX, 5 мкМ, 1 мкл;
- Полимеразу HS Taq (Евроген, Россия), 0,5 мкл;
- Очищенный продукт ПЦР 1, 2 мкл;
- Очищенную воду, 17,5 мкл.

Полученную смесь вносили в пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл и амплифицировали в термоциклере в соответствии со следующей программой: 94°C – 15 сек., 60°C – 15 сек., 72°C – 60 сек., 10-16 циклов. После окончания реакции ПЦР-продукт очищали с использованием магнитных частиц AMPure XP в соотношении 1:1, объем элюции составил 10 мкл.

Концентрацию готовых очищенных библиотек измеряли с помощью набора для измерения концентрации двухцепочечной ДНК (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, США) на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Затем библиотеки были секвенированы на платформе Illumina NovaSeq (длина чтения 2 × 150 нт). Полный перечень библиотек с количеством полученных прочтений приведён в Приложении Б.

3.11. Получения библиотек для секвенирования транскриптома *in vitro* стимулированных Т-клеток

Оставшаяся тотальная РНК, выделенная из лизированных *in vitro* стимулированных Т-клеток, была разделена на две части, которые были использованы в качестве технических реплик для получения транскрипционных профилей. Выделение мРНК из общего пула было выполнено с помощью магнитных частиц с олиго-dT из набора NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England Biolabs, США) в соответствии с протоколом производителя. Затем на основе обогащённой фракции мРНК были приготовлены библиотеки для секвенирования с помощью набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, США). Пробоподготовка была выполнена в соответствии с протоколом производителя и состояла из следующих этапов:

- фрагментация и синтез кДНК с рассеянным праймером,
- синтез второй цепи ДНК с добавлением dUTP,
- достройка концов и добавление dATP к 3'-концу двухцепочечной ДНК,
- лигирование адаптеров и удаление второй цепи с помощью фермента USER,
- амплификация и введение индексов.

На последнем этапе в ампликоны каждой библиотеки были введены нуклеотидные последовательности, которые содержали уникальный индекс и адаптер, необходимый для дальнейшего секвенирования по технологии Illumina (NEBNext Multiplex Oligos for Illumina, New England Biolabs, США). Секвенирование было выполнено на платформе Illumina NovaSeq (длина чтения 2×150 нт). Полный перечень библиотек с количеством полученных прочтений приведён в Приложении Б.

3.12. Обработка и анализ данных секвенирования

3.12.1. Реконструкция репертуаров кДНК β -цепей TCR

Обработка данных секвенирования, содержащих UMIs (PBMCs и большие субпопуляции Т-клеток) состояла из двух этапов. Первичная обработка была выполнена с помощью программ, которые анализируют UMIs и на основании полученных результатов исправляют ошибки ПЦР и секвенирования: для образцов донора, вакцинированного против гриппа, был использован MiGEC v1.2.9 [125], а для образцов доноров, вакцинированных против КЭ, – MiNNN v10.1 (<https://github.com/milaboratory/minnn>). Затем по скорректированным данным были собраны

репертуары β -цепей TCR с помощью программы MiXCR v3.0.13 [127], которая определяет CDR3, идентифицирует V-, D- и J-сегменты и подсчитывает клональную численность в полученном репертуаре. Количество UMIs и клонов в итоговых репертуарах приведено в Приложении Б.

Данные секвенирования библиотек *in vitro* стимулированных Т-клеток не содержали UMIs, поэтому сразу были обработаны программой MiXCR v3.0.13. В отсутствие UMIs программа подсчитывает количество пар прочтений, для которых успешно идентифицированы V-, D- и J-сегменты и CDR3, учитывая качество прочтения отдельных нуклеотидов. Затем это количество трансформируется в значение численности каждого клона в репертуаре. Поскольку для образцов с очень маленьким количеством клеток было выполнено очень глубокое секвенирование и в полученных данных отсутствуют UMIs, мы выполнили предварительную фильтрацию, оставив только клоны с достаточно высокой представленностью в репертуаре. Для этого суммарная численность клонов была нормализована на количество клеток в каждом образце, а затем все клоны, скорректированная численность которых стала меньше 1, были удалены из репертуара. Таким образом, мы исключили клоны, собранные на основе единичных прочтений, которые могли возникнуть в результате ошибок ПЦР и секвенирования. После фильтрации в репертуарах сохранилось более 90% от первоначальной суммарной численности клонов, но при этом было удалено большое количество низко представленных клонов (Рисунок 12). Итоговое количество клонов и их численность также приведены в Приложении Б.

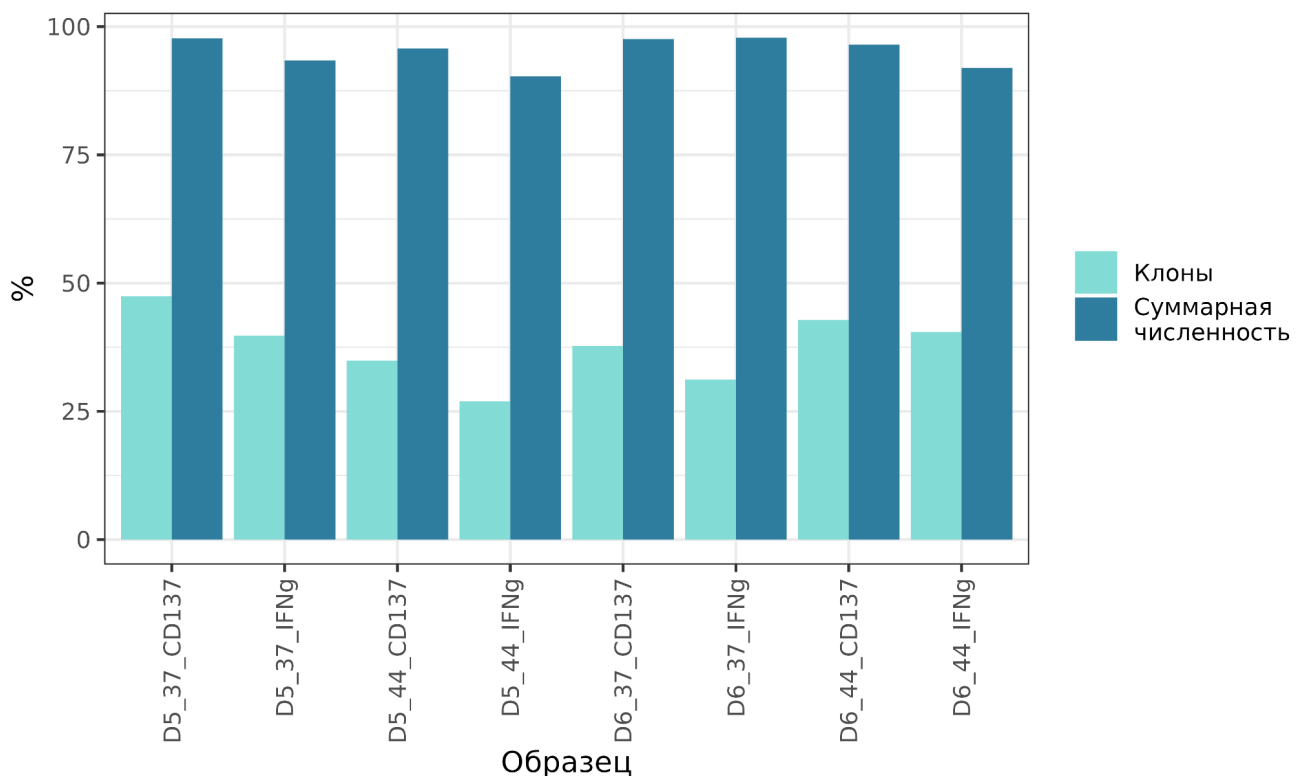


Рисунок 12. Доля клонов и их суммарной численности, которые остались после фильтрации, выраженные в процентах.

3.12.2. Транскриптомы *in vitro* стимулированных Т-клеток

Полученные прочтения были предварительно обработаны с помощью программы AfterQC v0.9.7 [157], которая удаляет прочтения плохого качества и обрезает последовательности, соответствующие введённым в ходе пробоподготовки адаптерам. Для дальнейшего выравнивания секвенированных последовательностей были использованы референсный геном человека и его аннотация из базы данных GENCODE (сборка GRCh38.p13, версия 43) [158]. Выравнивание, удаление идентичных последовательностей (ПЦР-дубликатов) и подсчёт количества прочтений на ген было выполнено с помощью программы STAR v2.7.10a [159] в комбинации с программой SAMtools, использованной для маркировки дубликатов [160].

3.12.3. Программы и пакеты, использованные для анализа и визуализации данных

Анализ и визуализация данных были выполнены с помощью языка программирования R (<http://www.R-project.org>). В качестве рабочей среды была выбрана программа RStudio (<http://www.rstudio.com>).

Дополнительные программы и R-пакеты для анализа данных: *edgeR*, *stringdist*, *tidyverse*, *igraph*, *tidygraph*, *DescTools*, *ALICE*, *OLGA*, *VDJmatch*.

Дополнительные программы и R-пакеты для визуализации данных: *ggplot2*, *ggraph*, *ggseqlogo*, *ggpattern*, *ggpubr*, *rstatix*, *ComplexHeatmap*, *viridis*, *RColorBrewer*, *Gephi*, *FlowJo*, *Inkscape*, *BioRender*.

4. Результаты и обсуждение

4.1. Дизайн исследований

Для изучения влияния инактивированных вакцин на репертуар TCR человека нами были выбраны две одобренные вакцины: трёхвалентная субъединичная вакцина против гриппа Inﬂuvac® и цельновирионная инактивированная вакцина против КЭ Клецц-Э-Вак®.

В первом исследовании участвовал один донор (мужчина, 58 лет), который в течение трёх лет ежегодно прививался сезонной субъединичной вакциной Inﬂuvac® (2014/2015, 2015/2016 и 2016/2017). Вакцины всех сезонов имели в составе общий штамм, подобный штамму вируса гриппа A/California/7/2009(H1N1)pdm09. До и после вакцинации были получены образцы периферической крови в соответствии со схемой на Рисунке 13А и выделены парные фракции PBMCs (биологические реплики) и субпопуляции CD4⁺, CD8⁺ и “non-naïve” Т-клеток.

Второе исследование включало в себя 11 доноров: 7 женщин и 4 мужчин, в возрасте от 24 до 60 лет (медиана 27 лет, Q1 = 25 – Q3 = 32), и было проведено в период с 2016 по 2018 года. Каждый донор дважды получил цельновирионную вакцину Клецц-Э-Вак® с интервалом в 30 дней, согласно утверждённому протоколу иммунизации [95]. Для 10 доноров отсутствуют какие-либо записи о ранее перенесённом КЭ или вакцинации против него, донор #9 за 10 лет до исследования прошёл курс вакцинации против КЭ. Также для доноров ранее были определены HLA-генотипы (Приложение В).

Образцы периферической крови были получены до и после вакцинации против КЭ в соответствии со схемой на Рисунке 13Б. В каждой временной точке были выделены парные фракции PBMCs (биологические реплики), дополнительные аликвоты были использованы для выделения CD4⁺, CD8⁺ и CD45RO⁺ Т-клеток. На 37-й и 44-й дни часть PBMCs двух доноров (#5 и #6) была использована для *in vitro* стимуляции инактивированными очищенными частицами вируса КЭ с последующим выделением Т-клеток, экспрессирующих CD137 или продуцирующих IFN γ . Также была измерена концентрация IgG, специфичных к вирусу КЭ, в сыворотке крови вакцинированных доноров.

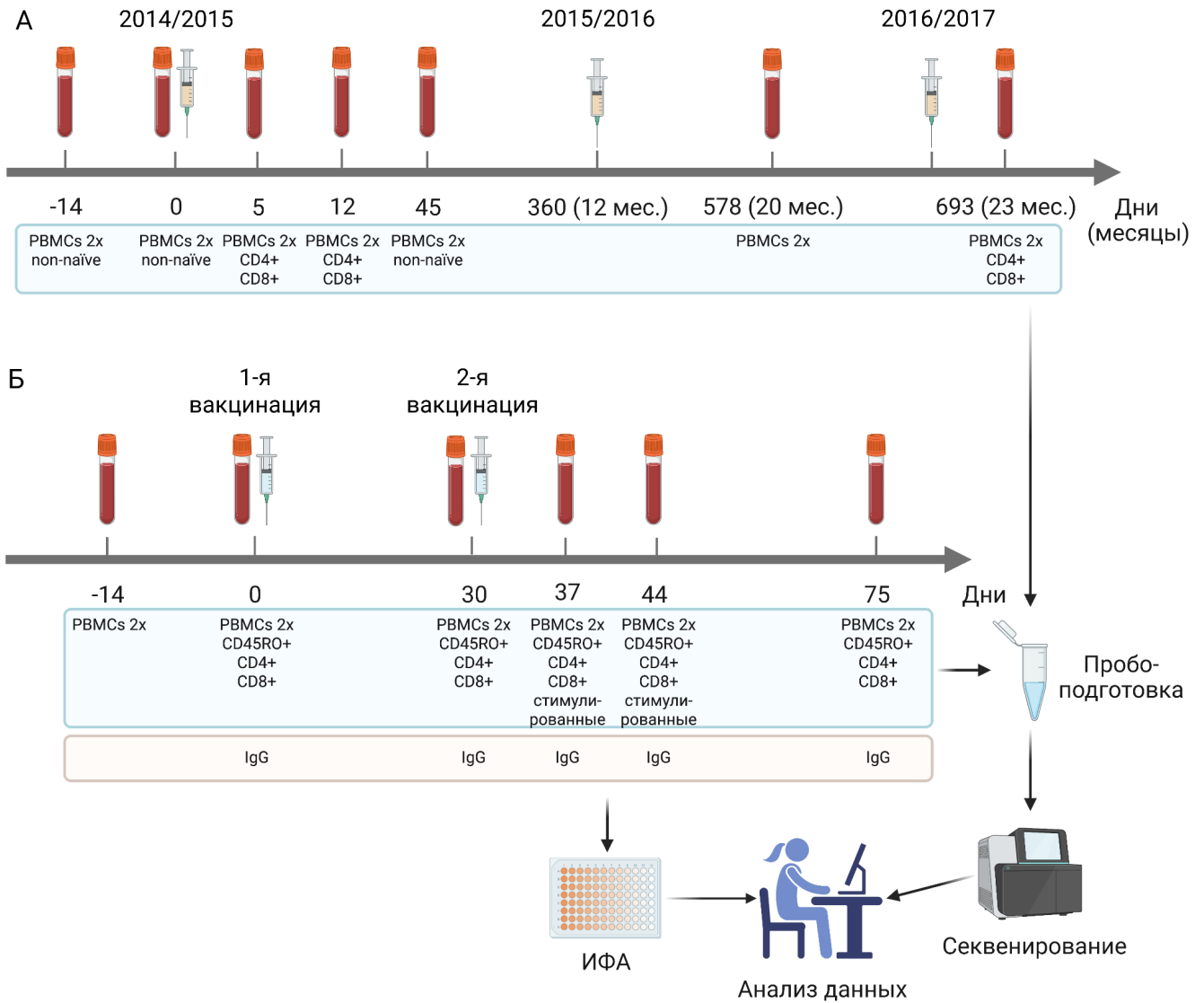


Рисунок 13. Расписание вакцинации и забора образцов крови для доноров, вакцинированных против гриппа (А) и против КЭ (Б). Для каждой временной точки указаны выделенные в этот день субпопуляции клеток, на основе которых потом были приготовлены и секвенированы библиотеки кДНК β -цепей TCR. Для доноров, получивших вакцину против КЭ, также была определена концентрация специфичных к вирусу КЭ IgG в сыворотке крови методом ИФА.

4.2. Получение и обработка данных секвенирования

4.2.1. Репертуары β -цепей TCR PBMCs и больших субпопуляций Т-клеток

Для получения библиотек кДНК β -цепей TCR PBMCs и больших субпопуляций Т-клеток был применён оригинальный протокол пробоподготовки, основанный на технологии 5'-RACE+SMART с введением UMIs на этапе синтеза кДНК [161,162]. На основе выделенной

из клеток тотальной РНК была синтезирована цепь кДНК с использованием универсального праймера, комплементарного к консервативной последовательности С-сегмента β -цепи TCR. Универсальная последовательность с индексом и UMIs со стороны 3'-конца кДНК была введена благодаря эффекту смены матрицы во время синтеза кДНК. Дальнейший ПЦР проходил в два этапа, в результате которых были селективно амплифицированы фрагменты β -цепи TCR и введён второй индекс, уникальный для каждой библиотеки. Таким образом, во время пробоподготовки каждый образец получил двойное баркодирование, что позволило (i) увеличить количество одновременно секвенируемых образцов за счёт комбинаций пар индексов и (ii) выявить и исключить из анализа прочтения химерных молекул, возникшие в результате “обмена концов” в процессе секвенирования.

С помощью описанного метода были приготовлены и секвенированы 254 библиотеки кДНК β -цепей TCR PBMCs и больших субпопуляций Т-клеток, выделенных до и после иммунизации. В ходе дальнейшей биоинформатической обработки данных секвенирования были отфильтрованы прочтения плохого качества и исправлены ошибки ПЦР и секвенирования. Затем для каждого образца был реконструирован репертуар β -цепей TCR и посчитана клональная численность на основе UMIs.

4.2.2. Репертуары β -цепей TCR *in vitro* стимулированных Т-клеток

Т-клетки, экспрессирующие CD137 или продуцирующие IFN γ в ответ на стимуляцию инактивированными очищенными частицами вируса КЭ, были изолированы методом флуоресцентно-активированного клеточного сортирования. Затем из клеток была выделена тотальная РНК, $\frac{1}{3}$ которой была использована для синтеза кДНК β -цепей TCR.

Синтез каждой цепи кДНК начинался с универсального праймера, комплементарного к консервативной последовательности С-сегмента β -цепи TCR. Затем была выполнена амплификация методом мультиплексной ПЦР с использованием смеси праймеров, специфичных к различным вариантам V-сегментов β -цепи TCR. Такая стратегия пробоподготовки обладает более высокой чувствительностью и эффективностью, чем технология 5'-RACE+SMART [114,163] и поэтому лучше подходит для образцов с небольшим количеством Т-клеток. На финальном этапе амплификации также была введена пара индексов, уникальная для каждой библиотеки.

Этим методом было получено и секвенировано 8 библиотек кДНК β -цепей TCR *in vitro* стимулированных Т-клеток. В результате дальнейшей биоинформатической обработки данных были отфильтрованы прочтения плохого качества и реконструированы репертуары β -цепей TCR. Для каждого клона была определена его клональная численность на основе успешно выровненных прочтений с учётом качества прочитанных нуклеотидов.

4.2.3. Транскрипционные профили *in vitro* стимулированных Т-клеток

Оставшаяся тотальная РНК *in vitro* стимулированных Т-клеток была разделена на две части, которые были использованы в качестве технических реплик. Каждый образец был обогащён фракцией мРНК с помощью магнитных частиц с олиго-dT, а дальнейшая пробоподготовка была выполнена с помощью фирменного набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina. Полученные 16 библиотек были секвенированы на платформе Illumina.

Полученные данные секвенирования были очищены от прочтений плохого качества и ПЦР-дубликатов и выровнены на референсный геном человека. Готовые транскрипционные профили содержали список генов и количество выровненных прочтений для каждого из них. Для того, чтобы учесть влияние случайных факторов при пробоподготовке, для каждого гена мы взяли среднее значение по двум техническим репликам и, таким образом, получили усреднённый профиль экспрессии для каждой выделенной субпопуляции Т-клеток.

4.3. Изучение Т-клеточного ответа на противогриппозную вакцинацию

4.3.1. Анализ вакцин-индуцированной клональной экспансии

Для оценки влияния противогриппозной вакцины на отдельные клоны Т-клеток мы сравнили полные репертуары β -цепей TCR до и после вакцинации с помощью инструментов пакета edgeR [144,164]. Поскольку наблюдаемые изменения в репертуарах могут быть связаны не только с реальными иммунологическими процессами, но и со случайной вариабельностью, возникающей в результате отбора проб и в процессе пробоподготовки, мы предварительно оценили разброс клональной представленности между биологическими репликами PBMCs в каждой временной точке (Рисунок 14А). Затем мы попарно сравнили репертуары разных временных точек с помощью пермутационного (точного) теста, основанного на методе условного максимального правдоподобия с поправкой на квантиль (англ. *the quantile-adjusted conditional maximum likelihood method*) для того, чтобы обнаружить ярко выраженные изменения в представленности клонов со временем (Рисунок 14Б–Г).

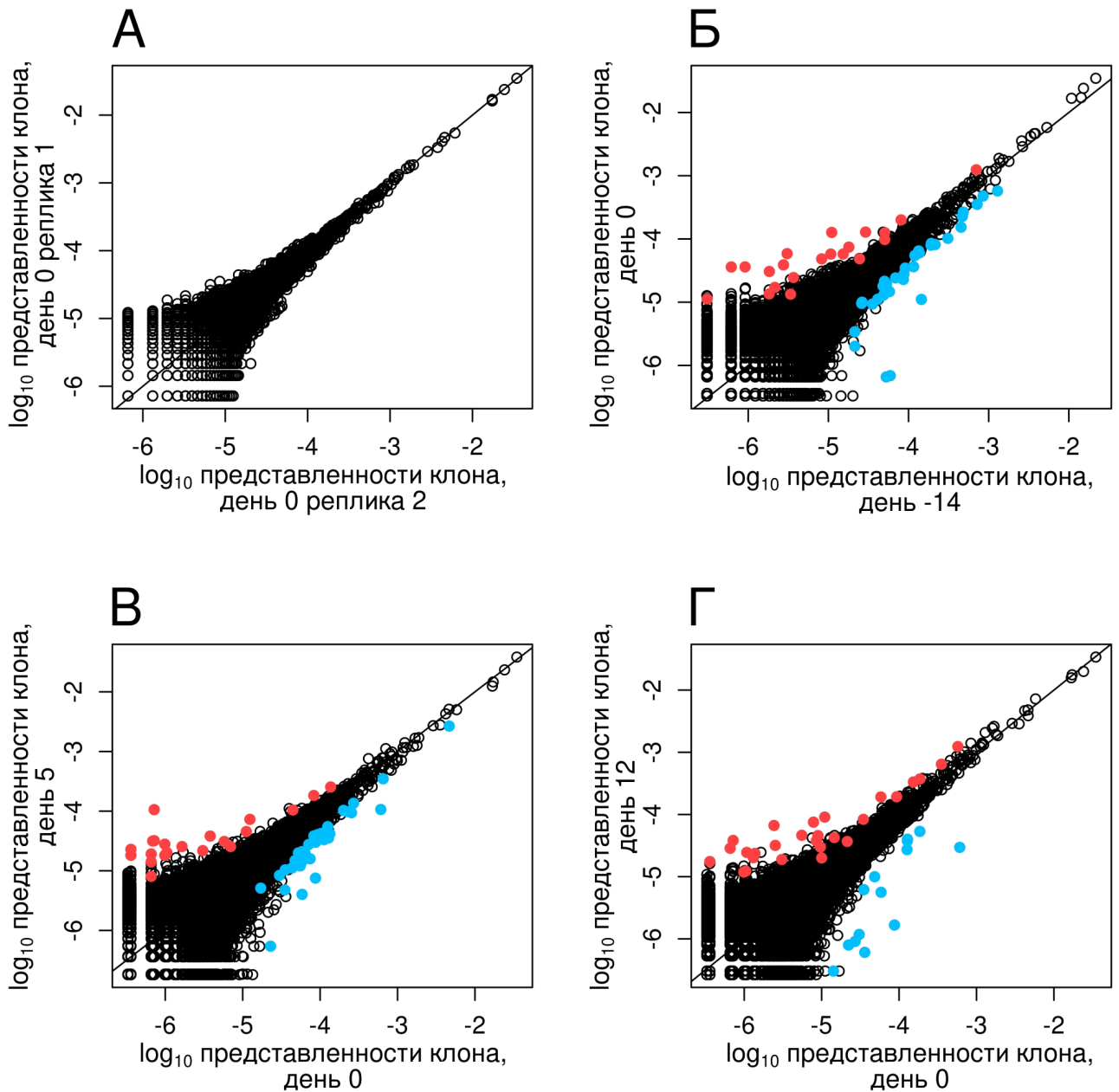


Рисунок 14. Диаграммы рассеяния, отображающие представленность клонов в репертуарах β -цепей TCR двух биологических реплик, полученных на день 0 (А), и двух временных точек: день 0 и день -14 (Б), день 5 и день 0 (В), день 12 и день 0 (Г). Каждая точка обозначает отдельный клон. На графиках Б–Г показано среднее значение по двум репликам соответствующего дня. Красным цветом обозначены клоны, представленность которых статистически значимо увеличилась со временем, голубым – клоны, представленность которых статистически значимо уменьшилась.

В результате сравнения мы получили десятки клонов, представленность которых статистически значимо изменилась в 2 и более раза ($p < 0,01$ после коррекции методом Бенджамини-Хохберга) между любыми двумя временными точками (левая часть Таблицы 1).

При этом количество клонов, представленность которых изменилась до введения вакцины (день -14 vs день 0), оказалось сопоставимым с количеством клонов, выявленных при сравнении репертуаров, полученных после вакцинации, с репертуаром дня 0 (день 5 vs день 0, день 12 vs день 0, день 45 vs день 0). С другой стороны, мы обнаружили небольшое преобладание доли “растущих” клонов (представленность которых увеличилась со временем) в парах репертуара дня 12 с репертуарами предыдущих дней (день 12 vs день -14, день 12 vs день 0, день 12 vs день 5; правая часть Таблицы 1). Можно предположить, что смещение баланса к 12-му дню произошло в результате экспансии ответивших на вакцинацию клонов, но тем не менее, ответ был недостаточно сильным для того, чтобы вызвать существенные перестройки в репертуаре β -цепей TCR. Эти наблюдения согласуются с результатами более ранних работ, в которых уже сообщалось об относительно слабом T-клеточном ответе на сезонную вакцинацию у взрослых [76,83–85].

Таблица 1. Количество клонов, представленность которых статистически значимо изменилась между двумя временными точками.

	Количество клонов					Отношение “растущие” / “падающие”			
	День -14	День 0	День 5	День 12	День 45	День 0	День 5	День 12	День 45
День -14	0	30	63	41	89	1,00	0,64	2,93	1,17
День 0	30	0	31	36	57		1,00	2,12	1,63
День 5	99	31	0	54	49			2,84	1,40
День 12	14	17	19	0	29				1,32
День 45	76	35	35	22	0				

В левой части таблицы значения над диагональю соответствуют количеству клонов, представленность которых со временем увеличилась (“растущие”), под диагональю – уменьшилась (“падающие”). Цвета ячеек соответствуют цветовым обозначениям на Рисунке 13. В правой части таблицы приведены отношения количеств “растущих” и “падающих” клонов.

4.3.2. Обнаружение “новых” клонов среди “non-naïve” T-клеток.

Поскольку антигенный состав противогриппозной вакцины ежегодно меняется, то даже в случае слабо выраженной клональной экспансии возможно появление новых клонов среди T-клеток памяти, входящих в состав субпопуляции “non-naïve” T-клеток. Для того, чтобы узнать приводит ли противогриппозная вакцинация к обогащению T-клеток памяти новыми клонами, мы сравнили репертуар субпопуляции “non-naïve” T-клеток, полученной через 1,5 месяца после вакцинации (день 45), с аналогичными репертуарами T-клеток, собранных до вакцинации (дни

-14 и 0). Перед сравнением каждый репертуар был отсортирован по клональной представленности (от большей к меньшей), после чего мы сформировали подмножества самых высокопредставленных клонов (топ-100, топ-200 и т.д.), при этом каждое следующее подмножество включало в себя предыдущее. Для каждого подмножества было определено количество уникальных (“новых”) клонов, которые отсутствовали в соответствующих подмножествах двух других репертуаров субпопуляций “non-naïve” Т-клеток (Рисунок 15, фиолетовая линия).

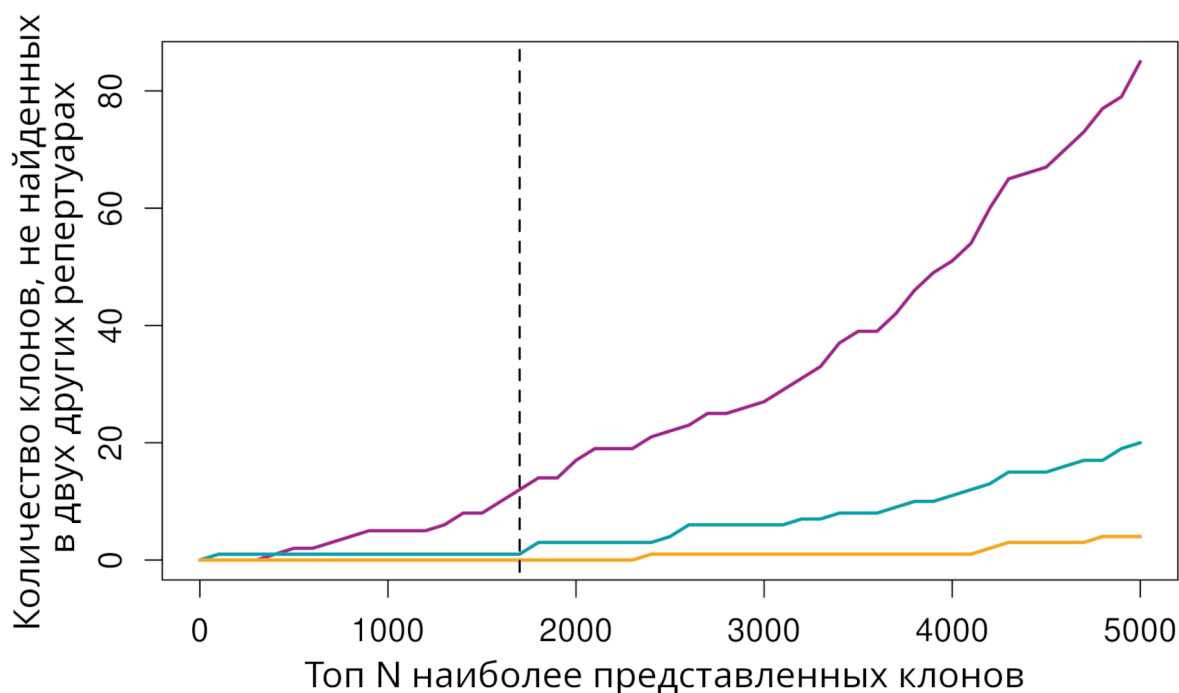


Рисунок 15. Количество уникальных клонов, найденных в каждом подмножестве наиболее высокопредставленных клонов для репертуаров “non-naïve” Т-клеток дня -14 (жёлтая линия), дня 0 (голубая линия) и дня 45 (фиолетовая линия). Вертикальная пунктирная линия обозначает подмножество с минимальным значением FDR (подробнее в тексте).

В результате сравнения мы ожидаемо увидели увеличение количества “новых” клонов с увеличением размера подмножества, что вероятно связано с влиянием случайных факторов на представленность клона при взятии образцов крови и дальнейшей пробоподготовке. Для того, чтобы исключить случайную вариабельность, мы оценили количество уникальных клонов, которые были выявлены в подмножествах репертуаров дней -14 и 0, так как мы предполагаем, что до вакцинации иммунная система не была подвержена сильной стимуляции и в этом случае “новые” клоны можно считать “ложноположительным результатом” (Рисунок 15, жёлтая и голубая линии). Таким образом, мы получили возможность оценить долю “ложных” клонов, найденных репертуаре дня 45, как отношение числа уникальных клонов на день 0 или день -14 к

числу уникальных клонов на день 45 того же подмножества (англ. *false discovery rate*, FDR). Минимальное значение FDR было получено для подмножества, содержащего 1700 наиболее высокопредставленных клонов (топ-1700, вертикальная пунктирная линия на Рисунке 15). Среди этих клонов в репертуаре “non-naïve” Т-клеток 45-го дня было обнаружено 13 “новых” клонов, клетки которых могли приобрести фенотип Т-клеток памяти в результате противогриппозной вакцинации.

Далее мы проследили динамику изменения представленности выявленных клонов в репертуарах PBMCs до и после вакцинации (Рисунок 16). Только 3 из 13 “новых” клонов присутствовали в хотя бы в одном репертуаре PBMCs, полученных до вакцинации, где имели очень низкую представленность (1-2 UMIs на $\sim 10^6$ секвенированных UMIs). Для всех клонов максимальная представленность была достигнута на день 45 после вакцинации, при этом для 8 из 13 клонов увеличение представленности оказалось достаточно выраженным для того, чтобы быть обнаруженными ещё и с помощью edgeR. В течение двух лет после первой иммунизации 9 из 13 клонов оставались на детектируемом уровне в образцах PBMCs, хотя повторные вакцинации не вызвали существенного увеличения их представленности.

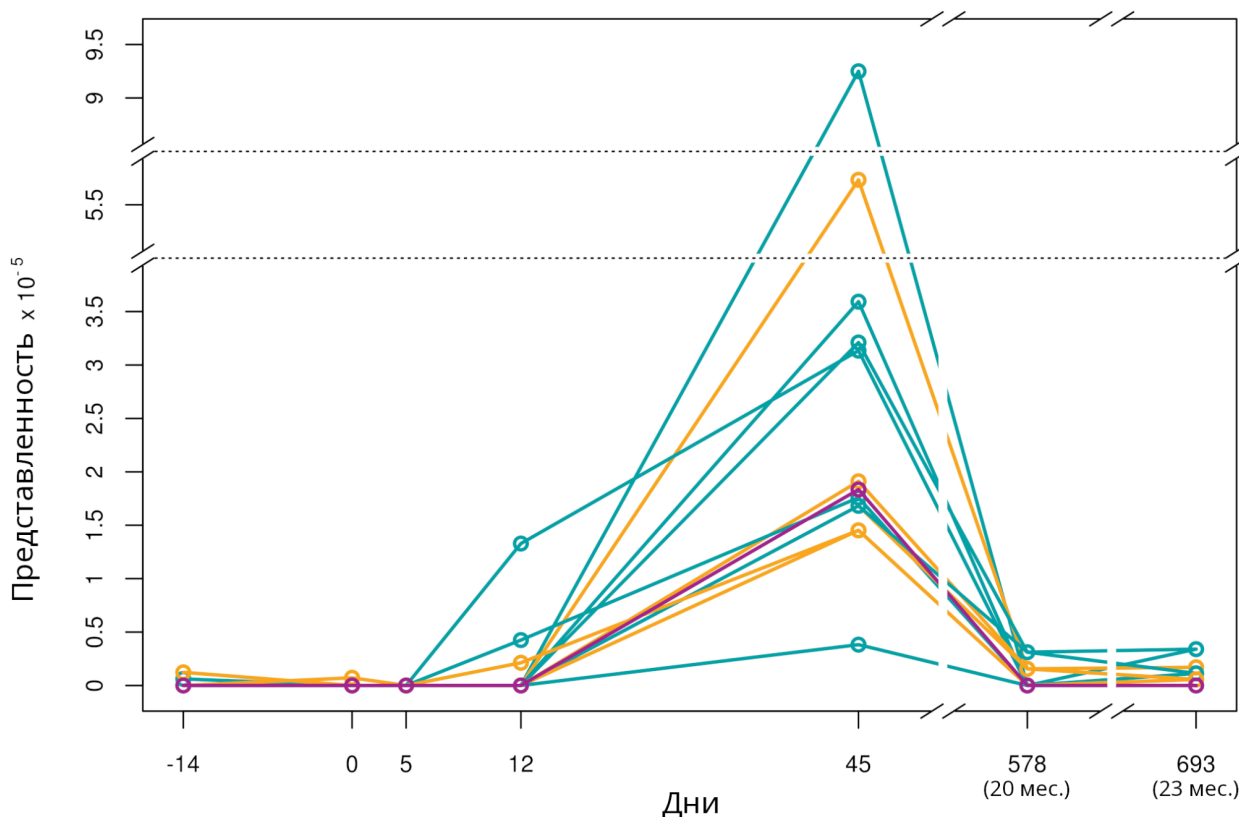


Рисунок 16. Динамика изменения представленности “новых” клонов, обнаруженных в репертуаре “non-naïve” Т-клеток 45-го дня. Голубым цветом обозначены $CD4^+$ Т-клеточные клоны, фиолетовым – $CD8^+$ Т-клеточные клоны, жёлтым – клоны, для Т-клеток которых фенотип не определён.

Мы также определили фенотипические характеристики Т-клеток “новых” клонов: 7 из 13 были обнаружены в репертуарах β -цепей TCR CD4⁺ Т-клеток и ещё 1 – CD8⁺ Т-клеток, для 5 клонов статус остался неизвестным (Рисунок 16). Однако, несмотря на преобладание CD4⁺ Т-клеточных клонов, полученное распределение не отличалось от фенотипического распределения для 1700 наиболее высокопредставленных клонов того же репертуара ($p = 0,63$ для точного теста Фишера и $p = 0,60$ для точного теста Барнарда).

Тем не менее, обнаружение “новых” клонов Т-клеток памяти с ярко выраженной экспансией после вакцинации является важным свидетельством в пользу того, что даже у взрослого индивида, который регулярно сталкивается с антигенами вируса гриппа, при каждой последующей вакцинации возможен рекрутинг новых клонов, их переход в субпопуляцию Т-клеток памяти и долговременное сохранение в организме. Таким образом, каждый раз происходит обновление противогриппозного иммунитета.

4.4. Изучение Т-клеточного ответа на вакцину против КЭ

4.4.1. Поиск вакцин-ассоциированных клонов и анализ их динамики

Для изучения Т-клеточного ответа на вакцину против КЭ мы применили тот же подход, что был описан выше для противогриппозной вакцинации (см. раздел 4.3.1). Сравнение репертуаров β -цепей TCR до и после введения вакцины было выполнено с помощью инструментов edgeR, а для учёта случайных факторов, влияющих на клональную представленность, были использованы репертуары биологических реплик PBMCs в каждой временной точке (Рисунок 17А,Б). В результате сравнения репертуаров разных временных точек было выявлено от 302 до 1706 вакцин-ассоциированных клонов для каждого донора, представленность которых увеличилась в 32 и более раза ($p < 0,01$ после коррекции методом Бенджамини-Хохберга) и которые отсутствовали в репертуарах β -цепей TCR PBMCs, полученных до вакцинации (Рисунок 17В).

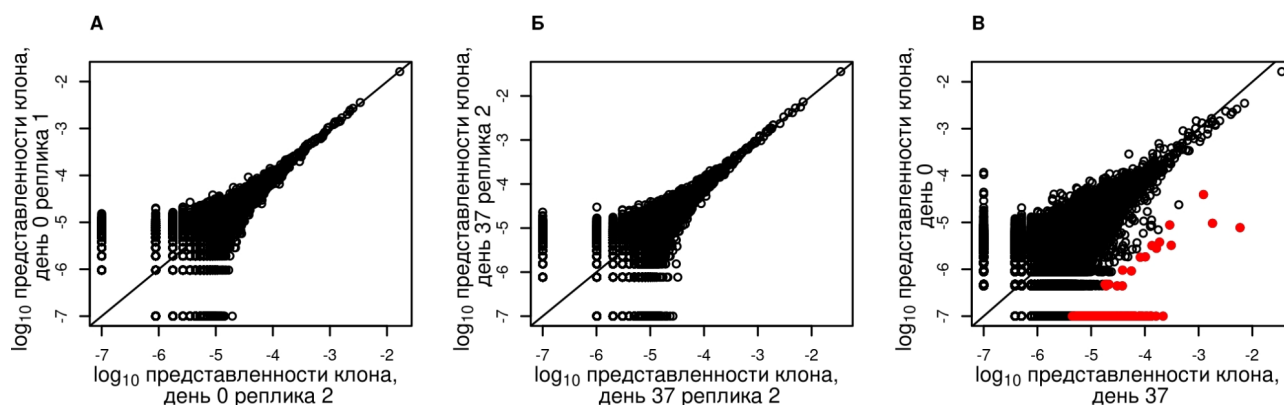


Рисунок 17. Диаграммы рассеяния, отображающие представленность клонов в двух репертуарах β -цепей TCR (пример для донора #5). **А, Б.** Две биологические реплики РВМС, полученных в день 0 (**А**) и день 37 (**Б**). **В.** Две временные точки: день 0 и день 37, показано среднее значение представленности по двум репликам соответствующего дня. Клоны, представленность которых статистически значимо увеличилась в 32 и более раза и которые отсутствуют в репертуарах РВМС дней -14 и 0, окрашены красным цветом.

Для всех доноров мы проследили общую динамику изменения представленности вакцин-ассоциированных клонов в репертуаре β -цепей TCR РВМС. Ответившие клоны суммарно занимали до 3,1% репертуара на пике экспансии, что свидетельствует о сильном Т-клеточном ответе на вакцинацию против КЭ (Рисунок 18А). Вместе с тем, мы выделили два основных паттерна клональной экспансии: клоны доноров #1–5, 8 демонстрировали максимальную суммарную представленность на день 37, в то время как клоны доноров #6, 7, 9–11 – на день 44. У двух доноров (#7 и #9) также был обнаружен небольшой пик на день 30. Вероятно, полученные различия могут быть следствием индивидуальных особенностей развития Т-клеточного ответа на двухэтапную вакцинацию. В связи с этим при изучении иммунного ответа на вакцины со сложной схемой иммунизации целесообразно включать в анализ несколько временных точек после введения второй и последующих вакцин.

В то же время, динамика концентрации IgG, специфичных к вирусу КЭ, была одинаковой практически у всех доноров и достигла наибольшего значения через две недели после второй вакцинации (день 44, Рисунок 18Б). Такое расхождение с динамикой представленности Т-клеточных клонов указывает на то, что антительный ответ не отражает индивидуальные особенности адаптивного иммунного ответа на вакцину против КЭ, и ещё раз подчёркивает необходимость комплексного подхода при изучении влияния вакцины на иммунитет.

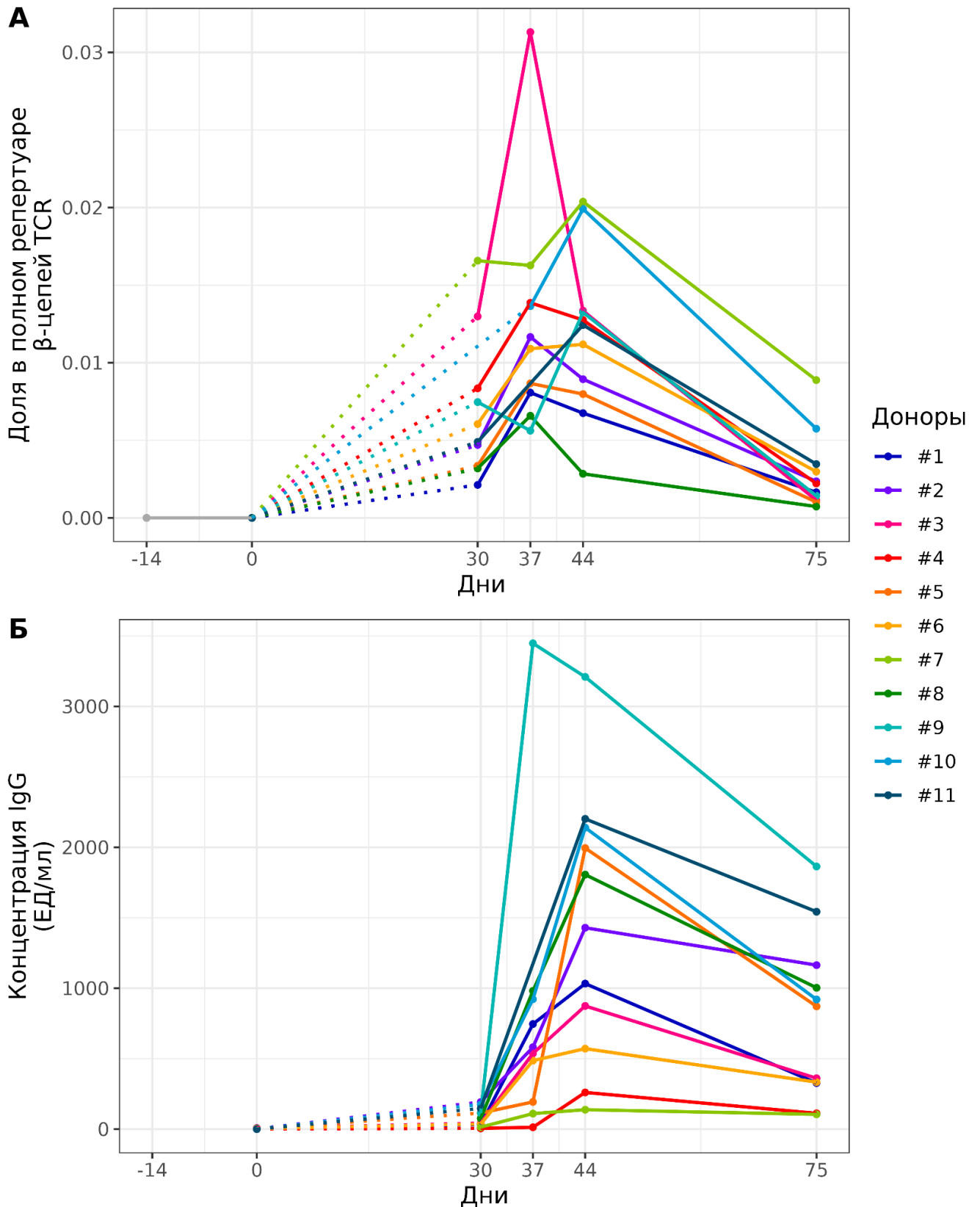


Рисунок 18. Динамика адаптивного иммунного ответа на вакцину против КЭ. **А.** Изменение суммарной представленности вакцин-ассоциированных клонов в репертуаре β -цепей TCR РВМСs. Представленность каждого клона рассчитывалась как среднее значение по двум репликам РВМСs. **Б.** Изменение концентрации IgG, специфичных к вирусу КЭ.

4.4.2. Фенотипические особенности Т-клеток вакцин-ассоциированных клонов

Для того, чтобы получить общие представления о функциональных свойствах Т-клеток ответивших клонов, мы оценили их присутствие в репертуарах β -цепей TCR различных фенотипических субпопуляций Т-клеток. Сравнив репертуары $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток мы смогли определить принадлежность Т-клеток вакцин-ассоциированных клонов к соответствующим субпопуляциям. Подмножества ответивших $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеточных клонов имели похожую динамику, за исключением трёх доноров (#6, #7 и #9), у которых клоны $CD8^+$ Т-клеток демонстрировали двух-пиковую динамику, тогда как клоны $CD4^+$ Т-клеток имели только один пик экспансии (Рисунок 19).

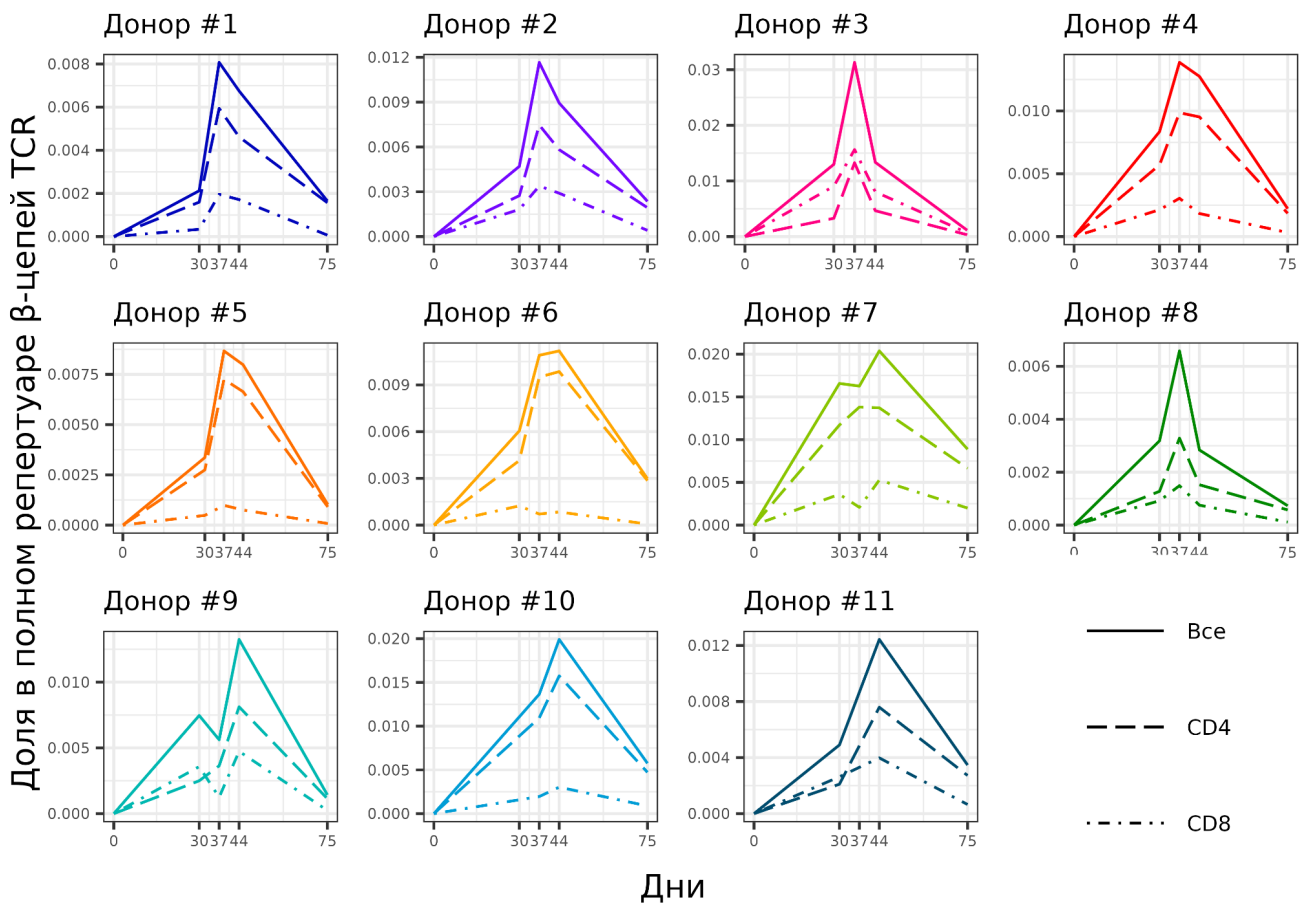


Рисунок 19. Динамика представленности подмножеств вакцин-ассоциированных клонов в репертуаре β -цепей TCR PBMCs: сплошной линией обозначена представленность всех вакцин-ассоциированных клонов, пунктирной – $CD4^+$, штрихпунктирной – $CD8^+$. Представленность каждого клона рассчитывалась как среднее значение по двум репликам PBMCs.

В то же время, соотношение $CD4^+/CD8^+$ Т-клеточных клонов, ассоциированных с вакцинацией, практически для всех доноров было значительно смещено в сторону $CD4^+$ как по доли клонов, так и по доли представленности на пике Т-клеточного ответа (Рисунок 20). Только для донора #3 мы наблюдали сопоставимую экспансию в обеих подмножествах с небольшим преобладанием $CD8^+$ Т-клеточных клонов (Рисунок 19). Тем не менее, у остальных доноров экспансия $CD8^+$ Т-клеточных клонов оказалась достаточно выраженной для того, чтобы превысить 32-кратный порог, и на пике экспансии суммарно занять до 0,53% репертуара β -цепей TCR PBMCs. Таким образом, в этой работе мы впервые показали, что инактивированная вакцина против КЭ способна стимулировать $CD8^+$ Т-клеточный ответ.

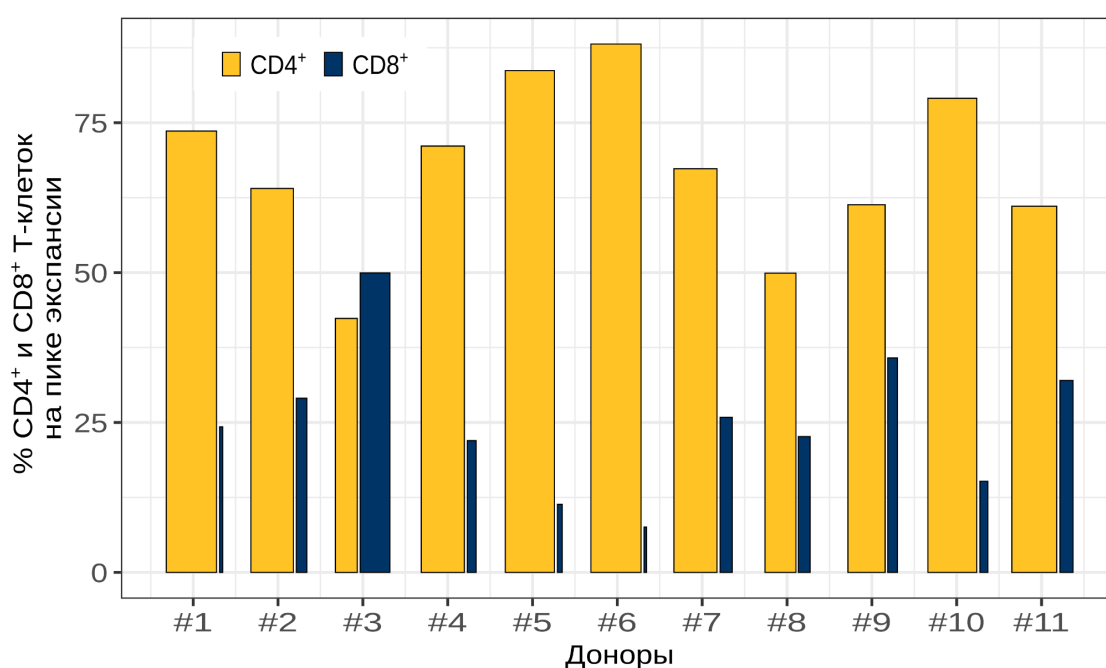


Рисунок 20. Доля $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеточных клонов от суммарной представленности всех вакцин-ассоциированных клонов на пике экспансии. Ширина столбика отражает соотношение количеств $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеточных клонов.

Аналогичный поиск вакцин-ассоциированных клонов был выполнен и в репертуарах β -цепей TCR субпопуляции $CD45RO^+$ Т-клеток, включающей различные подмножества Т-клеток памяти (T_{CM} , T_{TM} и T_{EM}) [62]. В общей сложности 58–79% ответивших клонов хотя бы один раз были обнаружены в репертуаре Т-клеток памяти и их количество увеличивалось после каждой иммунизации (Рисунок 21). При этом около половины ($46 \pm 17,7\%$) вакцин-ассоциированных клонов, впервые обнаруженных в субпопуляции Т-клеток памяти после второй вакцинации, отсутствовали и в репертуарах PBMCs, собранных в дни -14, 0 и 30. Это позволяет предположить, что повторная иммунизация через 30 дней не только

ре-стимулирует уже существующие Т-клетки памяти, но и приводит к рекрутингу новых клонов. Ещё одним важным наблюдением, объясняющим высокую эффективность вакцины против КЭ, является то, что до 70% вакцин-ассоциированных клонов оставались на детектируемом уровне в репертуаре Т-клеток памяти через 1,5 месяца после завершения курса вакцинации (день 75) и, вероятно, в дальнейшем могут обеспечить долгосрочную защиту от КЭ.

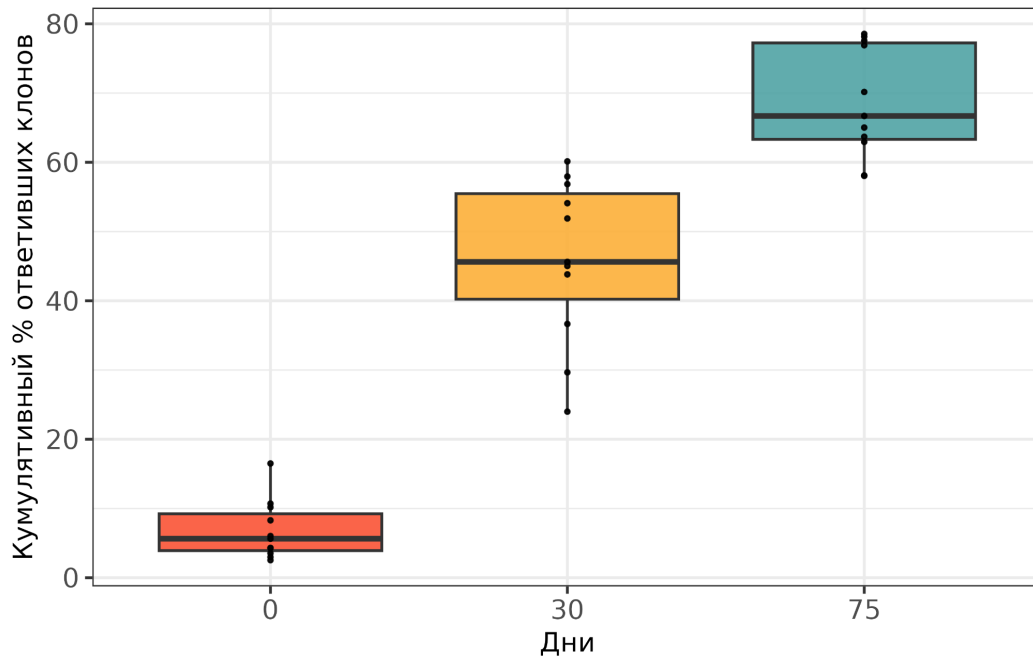


Рисунок 21. Кумулятивная доля вакцин-ассоциированных клонов, найденных в репертуарах β -цепей TCR субпопуляции Т-клеток памяти ($CD45RO^+$) на день 0 (0), к 30-му дню (30), к 75-му дню (75), от всех вакцин-ассоциированных клонов того же донора.

Интересно отметить, что от 3% до 16,5% вакцин-ассоциированных клонов были обнаружены в репертуаре Т-клеток памяти (но не PBMCs), полученных ещё до введения вакцины (день 0). Представленность этих клонов была крайне низкой и не коррелировала с глубиной секвенирования репертуара (Рисунок 22), поэтому мы предполагаем, что Т-клетки обнаруженных клонов действительно обладали фенотипом Т-клеток памяти и могли быть ре-активированы в результате перекрёстной специфичности TCR.

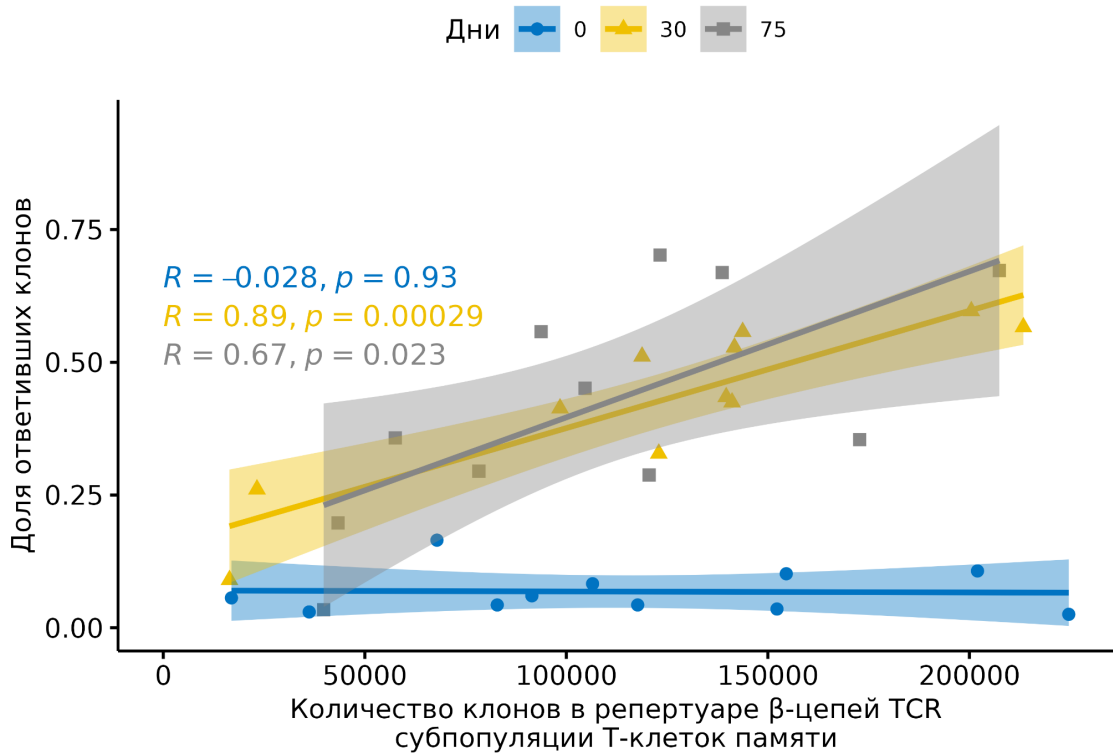


Рисунок 22. Корреляция между долей вакцин-ассоциированных клонов, найденных в репертуарах Т-клеток памяти, полученных в дни 0 (голубой), 30 (жёлтый) и 75 (серый), и количеством всех клонов в репертуаре соответствующей субпопуляции. Для каждой субпопуляции был рассчитан коэффициент корреляции Пирсона и отмечен 95% доверительный интервал.

Для подтверждения специфичности вакцин-ассоциированных клонов к эпитопам вируса КЭ мы проанализировали репертуар β-цепей TCR Т-клеток, экспрессирующих CD137 или продуцирующих IFN γ в ответ на *in vitro* стимуляцию инактивированными очищенными частицами вируса КЭ, для двух доноров (#5 и #6). Для обоих доноров около 10% вакцин-ассоциированных клонов были обнаружены в репертуарах *in vitro* активированных Т-клеток (Рисунок 23), что косвенно подтверждает их участие в иммунном ответе на вакцинацию против КЭ *in vivo*. Более того, 8 и 13 ответивших клонов (для доноров #5 и #6, соответственно) были найдены сразу в двух репертуарах (“double” на Рисунке 23). Также большая часть (77,8% и 85,5% для доноров #5 и #6, соответственно) “активированных” вакцин-ассоциированных клонов в дальнейшем была обнаружена в репертуарах Т-клеток памяти.



Рисунок 23. Вакцин-ассоциированные клоны, обнаруженные в репертуарах Т-клеток, экспрессирующих CD137 или продуцирующих IFN γ в ответ на *in vitro* стимуляцию инактивированными очищенными частицами вируса КЭ. В секторах указано количество найденных клонов.

Последующий сравнительный анализ “активированных” и остальных вакцин-ассоциированных клонов не выявил каких-либо различий в частотах использования V- и J-сегментов, распределении длин CDR3 и соотношении CD4⁺/CD8⁺ Т-клеточных клонов. Тем не менее, мы наблюдали более высокую представленность “активированных” вакцин-ассоциированных клонов в репертуаре PBMCs, собранных в тот же день, что и Т-клетки для *in vitro* стимуляции (двухсторонний критерий знаковых рангов Уилкоксона, $p < 0,0000308$ после коррекции методом Бенджамини-Хохберга), что указывает на возможное обнаружение большего количества “активированных” вакцин-ассоциированных клонов при увеличении глубины секвенирования репертуаров *in vitro* стимулированных Т-клеток. Также интересно отметить, что CD4⁺ Т-клеточные клоны преобладали даже среди клонов, обнаруженных в репертуаре IFN γ -продуцентов. В большинстве случаев CD4⁺IFN γ ⁺ Т-клетки относят к субпопуляции T_H1 [59].

4.4.3. Изучение динамики отдельных групп вакцин-ассоциированных клонов

Более детальное изучение Т-клеточного ответа показало, что общая динамика вакцин-ассоциированных клонов состоит из нескольких волн клональной экспансии различной величины. Мы разделили все вакцин-ассоциированные клоны на четыре группы: d30, d30_44, d37 и d44, в соответствии с днём, для которого была зафиксирована наибольшая представленность клона (Рисунок 24).

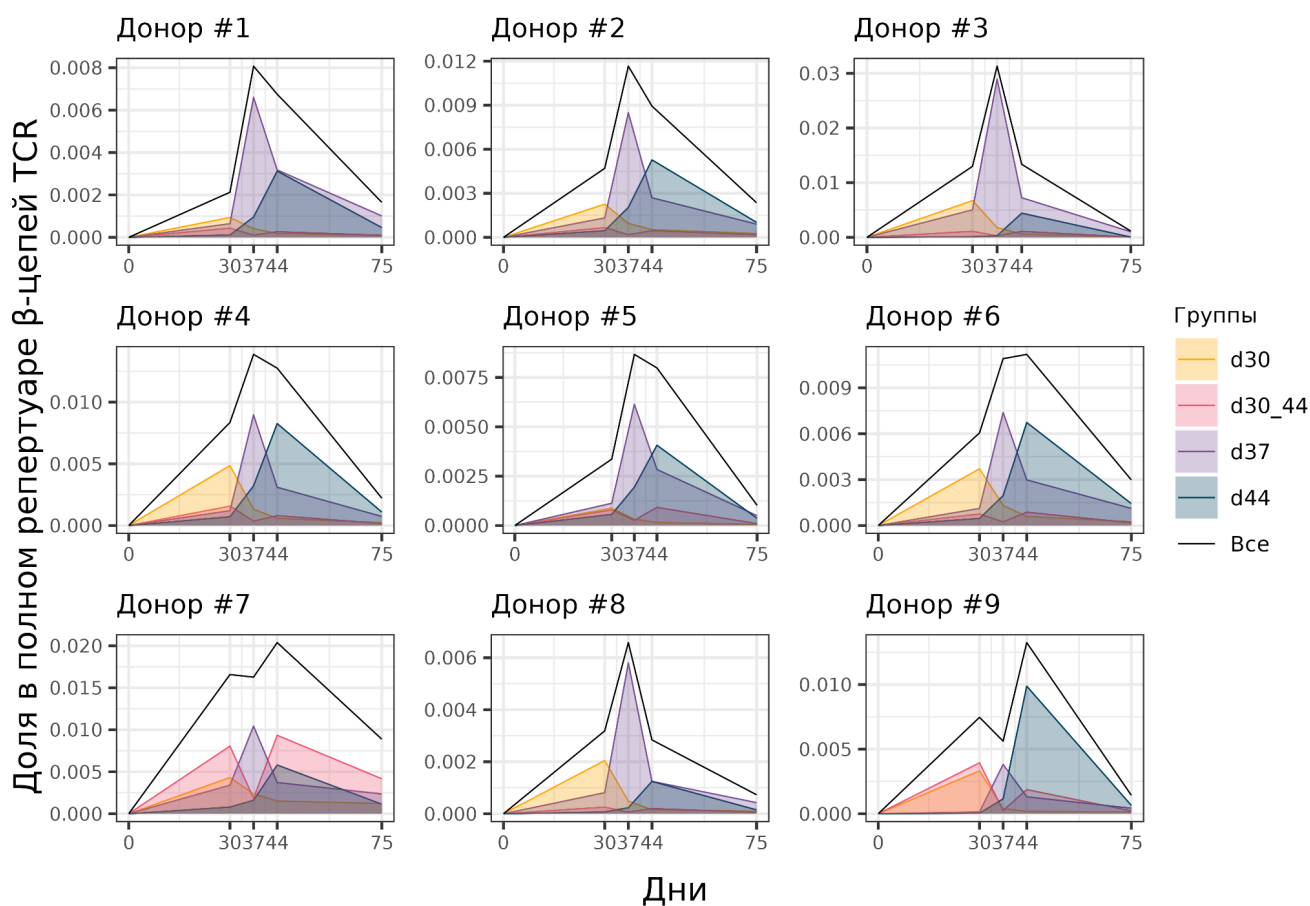


Рисунок 24. Динамика групп вакцин-ассоциированных клонов. В группу “d30” (желтый) входят клоны с наибольшей представленностью на день 30, в группу “d37” (фиолетовый) – на день 37, в группу “d44” (синий) – на день 44, клоны из группы “d30_44” (розовый) имеют два пика: на дни 30 и 44. Чёрной линией обозначена совокупная динамика всех клонов. Доноры #10 и #11 были исключены из анализа из-за неполного набора образцов.

Наиболее многочисленными оказались группы “d37” и “d44” с пиком экспансии на 37-й и 44-й дни, соответственно. Около $40,7 \pm 12\%$ клонов из группы “d37” и $26,6 \pm 15,3\%$ клонов из группы “d44” также были обнаружены в репертуаре Т-клеток памяти перед второй иммунизацией (день 30), что делает клоны из этих групп наиболее вероятными кандидатами на роль ре-активированных Т-клеточных клонов в ответ на повторное введение вакцины. При этом суммарно клоны из группы “d37” имели более высокую представленность в репертуаре Т-клеток памяти на день 30, чем клоны из группы “d44” (Рисунок 25, $p = 0,003906$ для двухстороннего критерия знаковых рангов Уилкоксона), что могло стать одной из причин более высокой скорости пролиферации в ответ на вторую вакцинацию. Помимо этого, на скорость пролиферации могли влиять и другие факторы, такие как клеточная численность клона на момент стимуляции, аффинность TCR [55], цитокиновый фон [165] и функциональное

состояние стимулированных Т-клеток [166,167]. В то же время часть клонов из групп “d37” и “d44” могли быть впервые рекрутированы только после второй вакцинации.

Но вместе с тем, мы не обнаружили статистически значимых различий в соотношении CD4⁺/CD8⁺ Т-клеточных клонов между группами “d37” и “d44” для всех доноров, кроме донора #8, у которого доля CD4⁺ Т-клеточных клонов была значительно ниже в группе “d44” (G-тест, p = 0,0017).

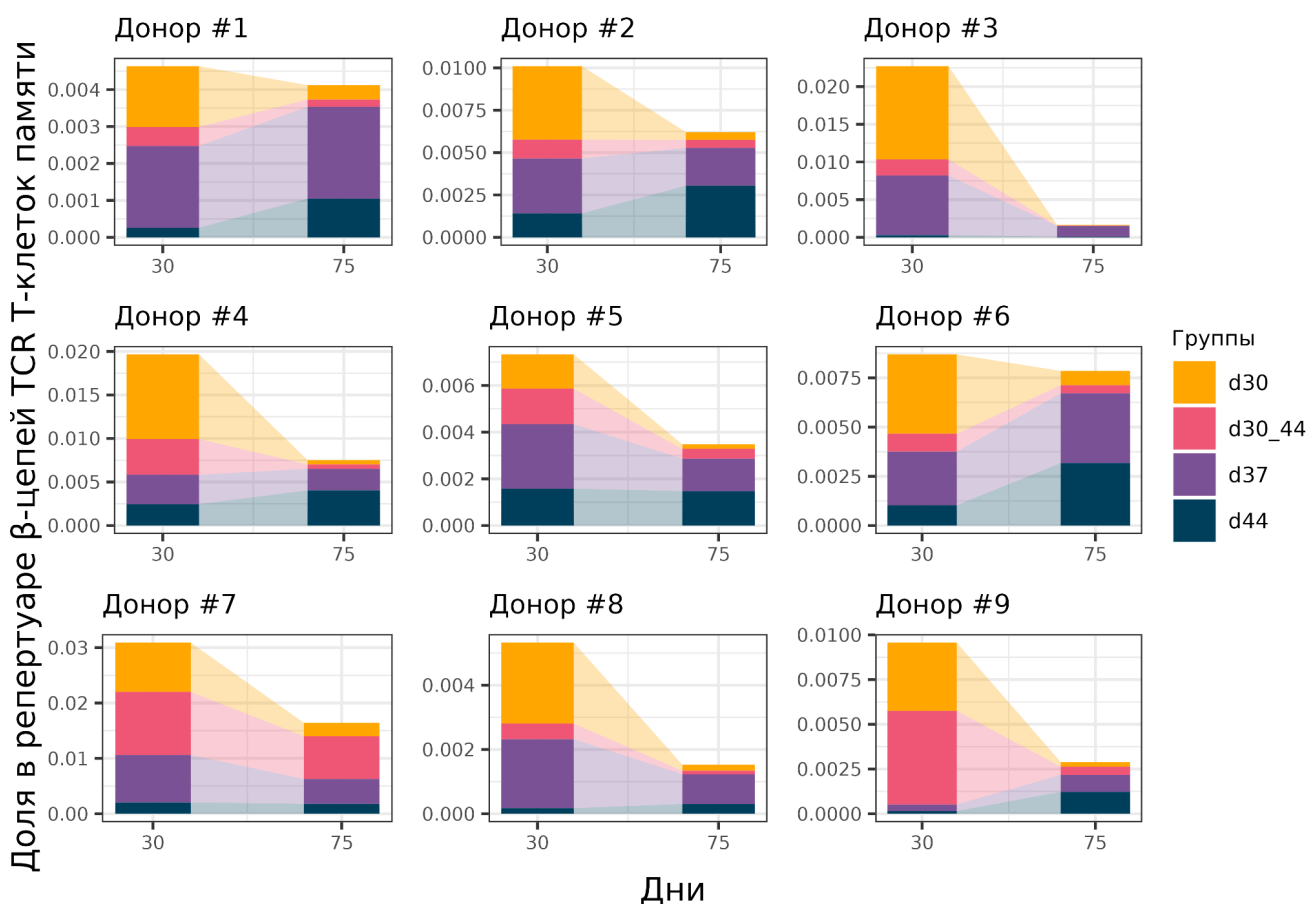


Рисунок 25. Представленность групп вакцин-ассоциированных клонов в репертуарах β-цепей TCR субпопуляции Т-клеток памяти (CD45RO⁺), полученных в дни 30 и 75.

Отдельное внимание привлекла группа “d30_44”, которая демонстрировала “двухпиковую” (дни 30 и 44) динамику, с сокращением представленности ко дню 37 и последующей повторной экспансией ко дню 44. У большинства доноров эта группа была минорной, однако, для доноров #7 и #9 её вклад в общий ответ оказался значительным, что привело к формированию “двухпикового” Т-клеточного ответа с наибольшей экспансией на день 44 (Рисунок 24, чёрная линия). Здесь важно отметить, что представленность клона, измеренная на день 30, соответствует фазе снижения клональной численности после ответа на первую вакцинацию, тогда как представленность на день 44 соответствует клональной

экспансии после второй вакцинации. Причины, по которым мы наблюдали экспансию клонов этой группы только через 2 недели после введения второй вакцины, могут быть аналогичными причинам “отложенной” экспансии для клонов из группы “d44”. Но вместе с тем, мы не наблюдали значительного увеличения клональной представленности на день 44, и пики на дни 30 и 44 оказались сопоставимыми для большинства клонов (Рисунок 26), что может указывать на низкий пролиферативный потенциал Т-клеток этой группы клонов.

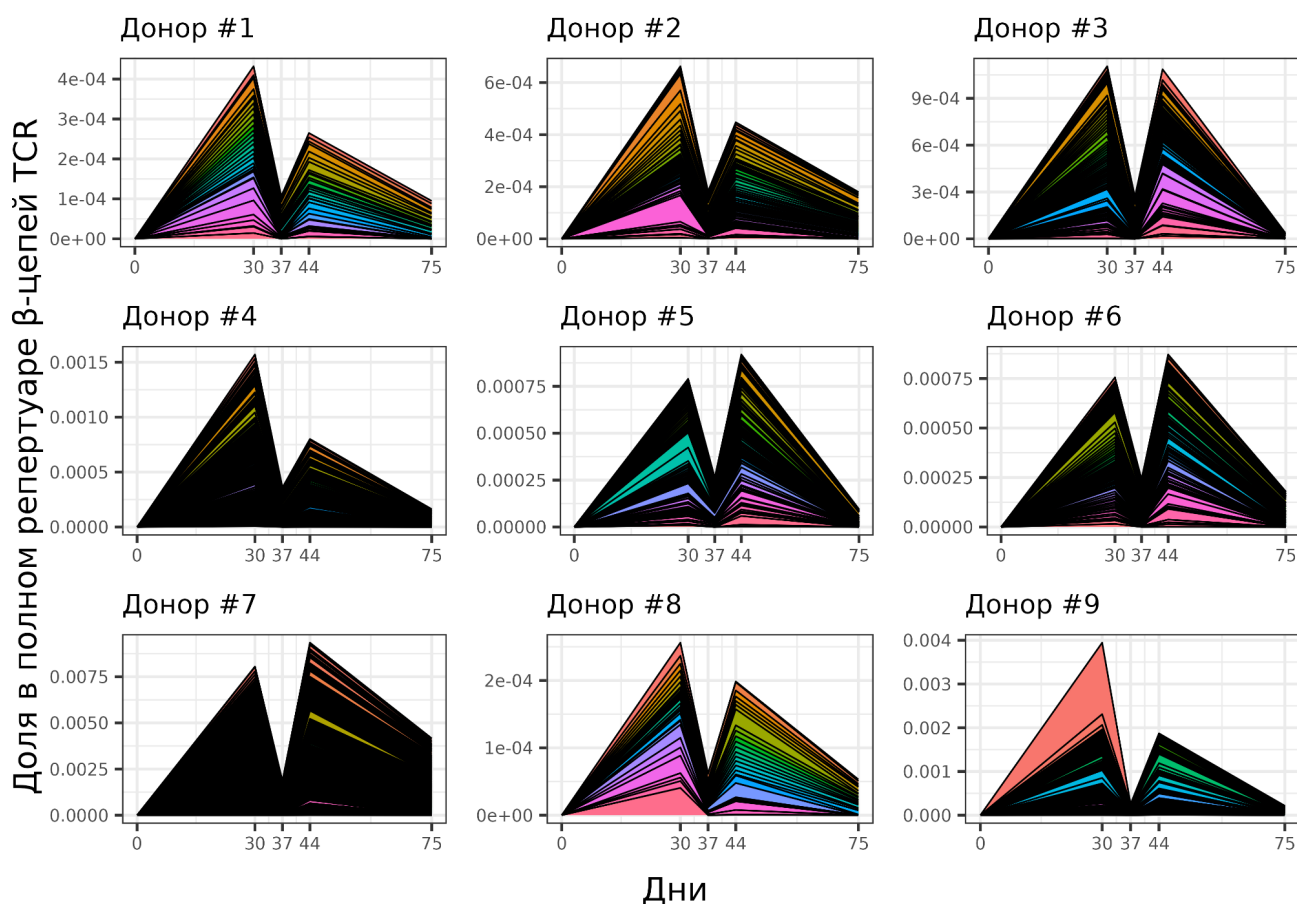


Рисунок 26. Вклад отдельных вакцин-ассоциированных клонов (показаны разными цветами) в динамику группы “d30_44”.

В отличие от описанных выше групп, представленность клонов из группы “d30” была наибольшей на день 30, а затем постепенно снижалась, несмотря на повторную иммунизацию. Но при этом около 70% клонов из этой группы было обнаружено в репертуаре Т-клеток памяти на день 30. Можно предположить, что одной из причин слабого ответа на рестимуляцию был истощённый фенотип Т-клеток данных клонов. Ранее Galletti и коллеги показали, что предшественники подобных истощённым Т-клеток памяти (*англ.* exhausted-like memory T cell progenitors, T_{PEX}) имеют более низкую скорость пролиферации и производят потомство с пониженной функциональной активностью, чем предшественники классических Т-клеток

памяти [168]. Авторы определили T_{PEX} как $CCR7^+PD-1^+TIGIT^+(GZMK^+)$ Т-клетки, но также показали, что они экспрессируют CD45RO, поэтому могут присутствовать в изолированной нами субпопуляции Т-клеток памяти. Т-клетки с истощённым фенотипом были замечены при различных видах инфекции и их образование в том числе может быть вызвано стимуляцией высокой дозой антигена, что обычно свойственно инактивированным вакцинам [169].

4.4.4. Сравнение аминокислотных последовательностей β -цепи TCR вакцин-ассоциированных клонов

Ранее было показано, что один антиген может вызвать активацию и стимулировать пролиферацию нескольких клонов с идентичной или похожей антигенной специфичностью, которая определяется аминокислотной последовательностью TCR [150,153], поэтому мы также ожидали обнаружить экспансию клонов с похожими последовательностями β -цепи TCR. Для того, чтобы это проверить, мы решили оценить сходство β -цепей TCR вакцин-ассоциированных клонов, попарно сравнив аминокислотные последовательности CDR3 клонов с идентичными V- и J-сегментами и одинаковой длиной CDR3. В результате сравнения было обнаружено до 142 клонов (медиана 27, $Q1 = 23,5 - Q3 = 38$), содержащих не более одной аминокислотной замены в CDR3 (расстояние Хэмминга ≤ 1), среди ответивших клонов каждого донора. При этом вакцин-ассоциированные клоны образовывали значительно больше пар с похожими β -цепями TCR, чем случайно отобранные клоны из репертуара PBMCs того же донора и с теми же комбинациями VJ-сегментов и длиной CDR3 (Рисунок 27). Это наблюдение указывает на конвергентную селекцию клонов с похожей антигенной специфичностью в ходе иммунного ответа на вакцину против КЭ.

Поскольку edgeR выявляет только клоны с ярко выраженной экспансией, другие клоны с низким уровнем пролиферации, но такой же антигенной специфичностью, как и обнаруженные вакцин-ассоциированные клоны, могли остаться незамеченными. По этой причине мы решили применить алгоритм ALICE в сочетании с OLGA [154,170] к репертуарам PBMCs, полученных в дни 30, 37 и 44. Этот подход позволяет выявить клоны, которые были подвержены конвергентной селекции, т.е. имеют больше “соседей” с похожими аминокислотными последовательностями TCR, чем ожидается согласно стандартной модели V(D)J-рекомбинации. Таким образом, для каждого донора мы обнаружили около 152 (медиана, $Q1 = 92 - Q3 = 231$) новых вакцин-ассоциированных клонов ($p < 0,001$ после коррекции методом Бенджамини-Хохберга), которые также отсутствовали в репертуарах PBMCs, полученных до вакцинации.

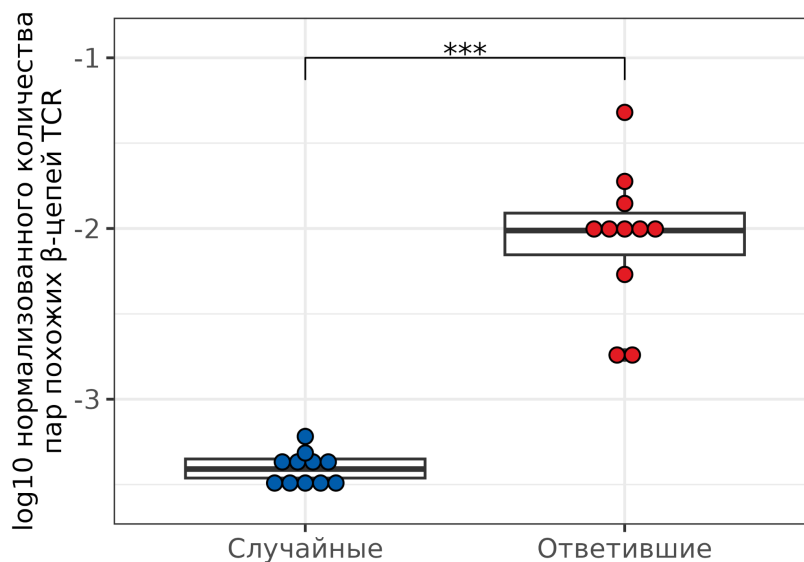


Рисунок 27. Сравнение количества пар клонов с похожими аминокислотными последовательностями β -цепей TCR (идентичные V- и J-сегменты и одинаковая длина CDR3, не более одной аминокислотной замены в CDR3) среди ответивших и случайно отобранных клонов одного донора, нормированных на количество возможных пар в каждом подмножестве клонов. Случайные клоны были отобраны из репертуаров PVMCs, полученных в дни 30, 37 и 44, для каждой выборки было подсчитано нормированное количество пар клонов. Для каждого репертуара PVMCs отбор случайных клонов и подсчёт пар был выполнен 100 раз, для сравнения с ответившими клонами было подсчитано среднее значение. Для оценки значимости был использован двухсторонний парный критерий знаковых рангов Уилкоксона, *** – $p = 0,00098$.

Все ответившие клоны затем были сгруппированы в кластеры клонов с похожими CDR3 (не более одной аминокислотной замены), но с идентичными V- и J-сегментами и одинаковой длиной CDR3 (Рисунок 28). В результате для каждого донора было сформировано около 35 кластеров (медиана, $Q1 = 28,5$ – $Q3 = 39,5$), многие из которых содержали как сильно экспандированные клоны (обнаруженные с помощью edgeR), так и клоны со слабо изменившейся представленностью (обнаруженные с помощью ALICE). Большое количество сформированных кластеров может указывать на специфичность вакцин-ассоциированных клонов к широкому спектру эпитопов вируса КЭ и, следовательно, формирование устойчивой к вирусным мутациям T-клеточной защиты.

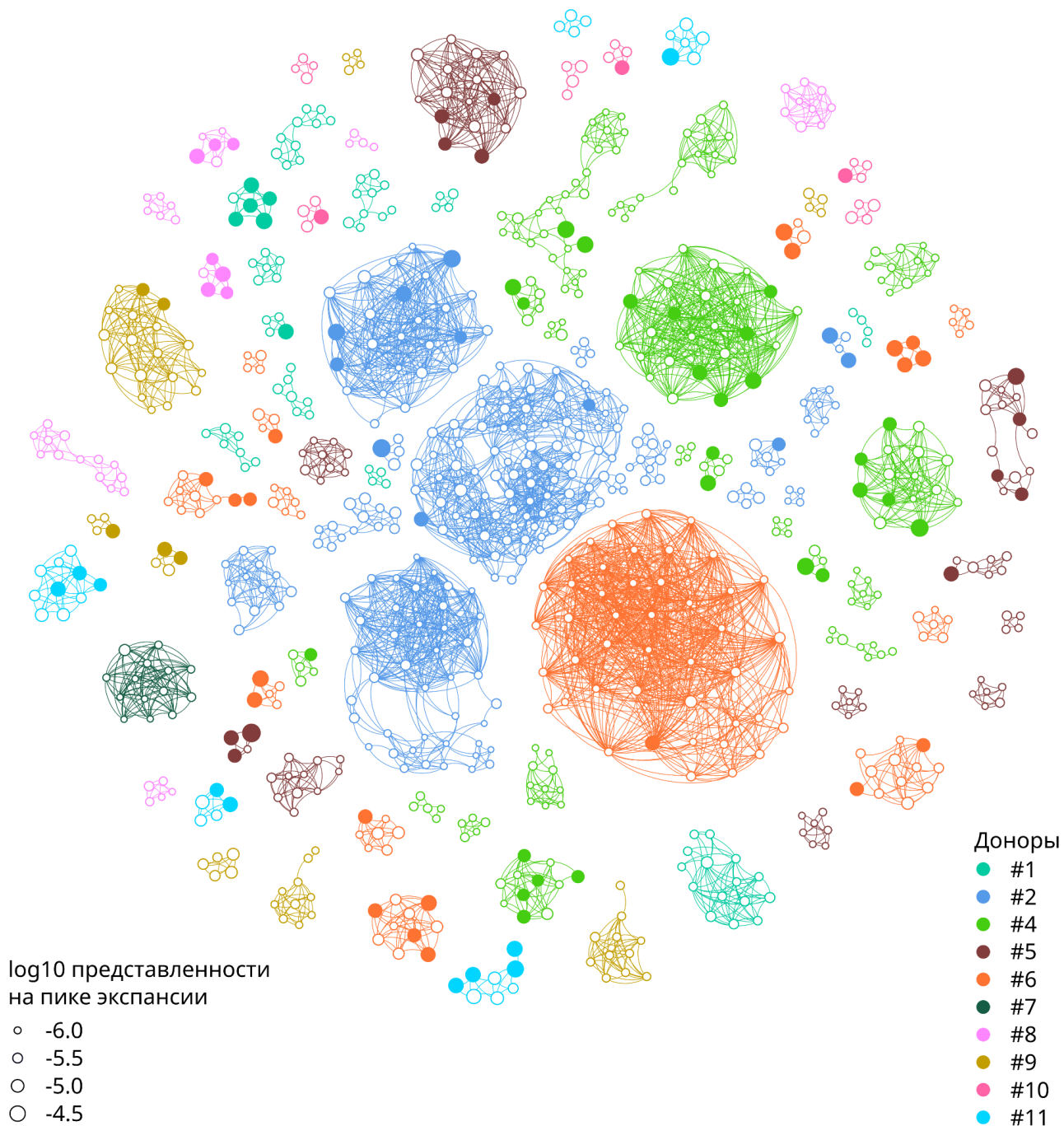


Рисунок 28. Кластеры вакцин-ассоциированных клонов с похожими аминокислотными последовательностями β-цепей TCR (идентичные V- и J-сегменты и одинаковая длина CDR3, не более одной аминокислотной замены в CDR3), представленные в виде графа. Каждая вершина соответствует отдельному клону, клоны с похожими β-цепями TCR и от одного донора соединены линиями. Показаны только кластеры с четырьмя и более клонами. Размер вершины соответствует наибольшей представленности клона (на пике экспансии). Закрашенные вершины обозначают клоны, идентифицированные edgeR. Донор #3 с 4249 похожими клонами не показан.

Затем мы проанализировали динамику изменения представленности клонов из одного кластера (для кластеров из четырёх и более клонов), и обнаружили, что только 22% (медиана, $Q1 = 13 - Q3 = 35$) кластеров содержали клоны с одинаковой динамикой (Рисунок 29). Это может свидетельствовать о том, что несмотря на высокую степень сходства аминокислотных последовательностей β -цепей TCR, Т-клетки этих клонов могли выполнять различные функции в ходе иммунного ответа. Также разная динамика может быть связана с различиями в аффинности TCR, приводя к более выраженной и быстрой экспансии более высокоаффинных клонов.

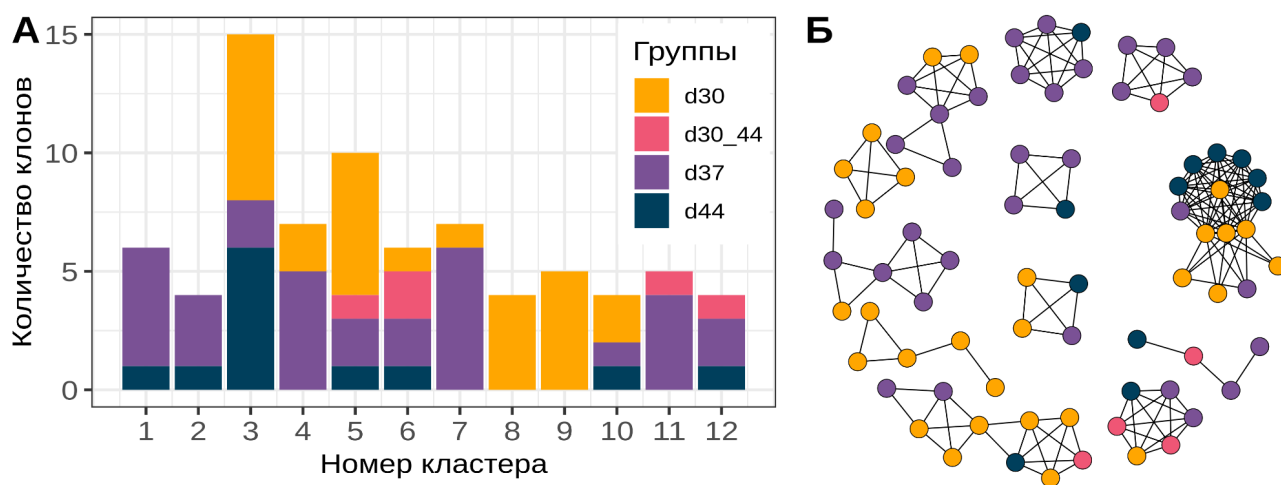


Рисунок 29. Динамика изменения представленности ответивших клонов из одного кластера, содержащего четыре и более вакцин-ассоциированных клонов с похожими аминокислотными последовательностями β -цепей TCR (идентичные V- и J-сегменты и одинаковая длина CDR3, не более одной аминокислотной замены в CDR3). **А.** Распределение клонов, относящихся к разным группам по типу динамики, в каждом кластере. **Б.** Кластеры вакцин-ассоциированных клонов, представленные в виде графа. Каждая вершина соответствует отдельному клону, клоны с похожими β -цепями TCR соединены линиями. Цветовое обозначение соответствует обозначению групп на столбчатой диаграмме слева (А). Показан пример для донора #1.

4.4.5. Сходство аминокислотных последовательностей β -цепей TCR вакцин-ассоциированных клонов разных доноров

Так как доноры с общими аллелями HLA (подробнее в Приложении В) получили идентичную вакцину, то можно предположить, что у них были сформированы идентичные или очень похожие комплексы рМНС, которые затем были распознаны Т-клеточными клонами с похожей специфичностью. Однако, прежде чем оценивать сходство вакцин-ассоциированных клонов разных доноров, мы исключили клоны с уже известной специфичностью ко многим

широко распространённым патогенам. Для этого мы выполнили поиск всех вакцин-ассоциированных в курируемой базе данных VDJdb [148] с помощью программы VDJmatch v1.3.1 [171]. Все клоны, соответствующие записям в базе с совпадающими аллелями HLA, V- и J-сегментами, идентичной длиной CDR3 и имеющие не более одной аминокислотной замены в CDR3, были исключены из последующего анализа.

Для отфильтрованных клонов мы оценили сходство аминокислотных последовательностей β -цепей TCR, попарно сравнив вакцин-ассоциированные клоны от разных доноров. Но так как пары похожих клонов могли возникнуть просто в результате высокой степени сходства репертуаров β -цепей TCR отдельных доноров, мы выполнили ту же процедуру для случайно отобранных клонов соответствующих доноров. Сравнение полученных выборок показало статистически значимое преобладание пар похожих клонов (идентичные V- и J-сегменты и одинаковая длина CDR3, не более одной аминокислотной замены в CDR3) среди вакцин-ассоциированных клонов (Рисунок 30).

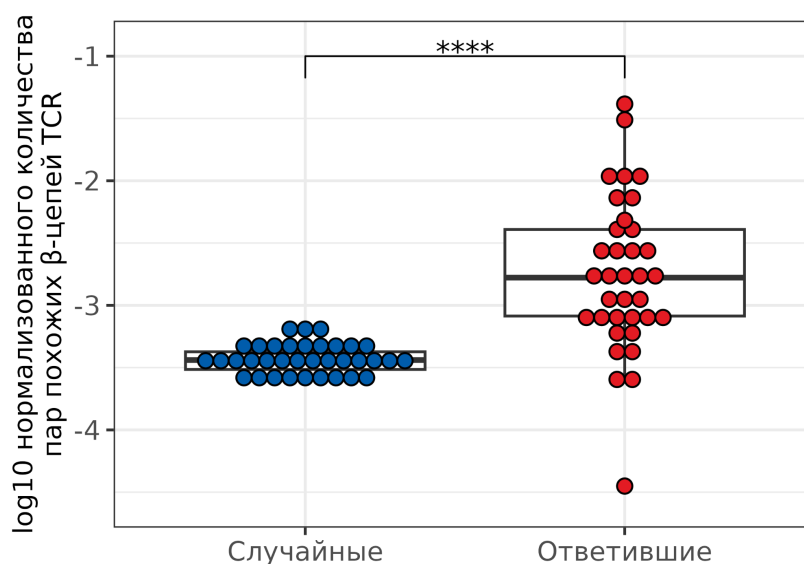


Рисунок 30. Сравнение количества пар клонов с похожими аминокислотными последовательностями β -цепей TCR (идентичные V- и J-сегменты и одинаковая длина CDR3, не более одной аминокислотной замены в CDR3) среди ответивших и случайно отобранных клонов разных доноров, нормированных на количество возможных пар в каждом подмножестве клонов. Случайные клоны были отобраны из репертуаров PVMCs, полученных в дни 30, 37 и 44, для каждой пары выборок от разных доноров было подсчитано нормированное количество пар клонов. Для каждой пары репертуаров PVMCs отбор случайных клонов и подсчёт пар похожих клонов был выполнен 100 раз, для сравнения с ответившими клонами было подсчитано среднее значение. Для оценки значимости был использован двухсторонний парный критерий знаковых рангов Уилкоксона, **** – $p = 3,2 \times 10^9$.

Затем мы объединили похожие клоны от всех доноров и получили 17 кластеров, состоящих из шести и более клонов, при условии, что каждый клон был похож хотя бы на два клона от других доноров (Рисунок 31). Больше половины кластеров (9 из 17) состояли из вакцин-ассоциированных клонов трёх и более доноров. Клоны четырёх кластеров (4, 6, 9 и 15) также были обнаружены в репертуарах субпопуляции CD8⁺ Т-клеток соответствующих доноров, а клоны из остальных кластеров – в репертуарах субпопуляции CD4⁺ Т-клеток. Ещё три и два клона из кластеров 8 и 17, соответственно, были обнаружены в репертуаре CD137⁺ Т-клеток донора #6, полученных в день 44. Для каждого кластера мы определили мотив аминокислотной последовательности CDR3 (Рисунок 32).

Вероятно, преобладание CD4⁺ кластеров является следствием преимущественной активации CD4⁺ Т-клеток в ответ на инактивированную вакцину против КЭ (подробнее в разделе 4.4.2), а следовательно, и бóльшим разнообразием CD4⁺ Т-клеточных клонов, что обеспечивает более высокую вероятность совпадения аминокислотных последовательностей β-цепей TCR у разных доноров. Ранее Schwaiger и коллеги идентифицировали пептиды вируса КЭ, представляющие собой наиболее многообещающие кандидаты в иммунодоминантные эпитопы для активации CD4⁺ Т-клеток [99]. Поскольку доноры из нашей работы и из исследования Schwaiger *et al.* имеют совпадающие аллели HLA, совокупность полученных результатов можно в дальнейшем использовать для моделирования *in silico* и затем создания *in vitro* первых мультимеров HLA класса II с эпитопами вируса КЭ.

Мотивы, полученные для кластеров CD8⁺ Т-клеточных клонов, также могут быть полезными для поиска иммунодоминантных эпитопов структурных белков вируса КЭ, которые презентуются в составе HLA класса I. В трёх случаях мы смогли определить аллели HLA, общие для всех доноров из кластера: HLA-C*12:03 для кластера 4, HLA-C*07:02 и HLA-C*12:03 для кластера 9, и HLA-B*08:01 для кластера 15. Полученные комбинации β-цепей TCR и аллелей HLA в дальнейшем можно использовать для построения 3D-моделей и поиска кандидатных комплексов рМНС для создания соответствующих мультимеров HLA класса I.

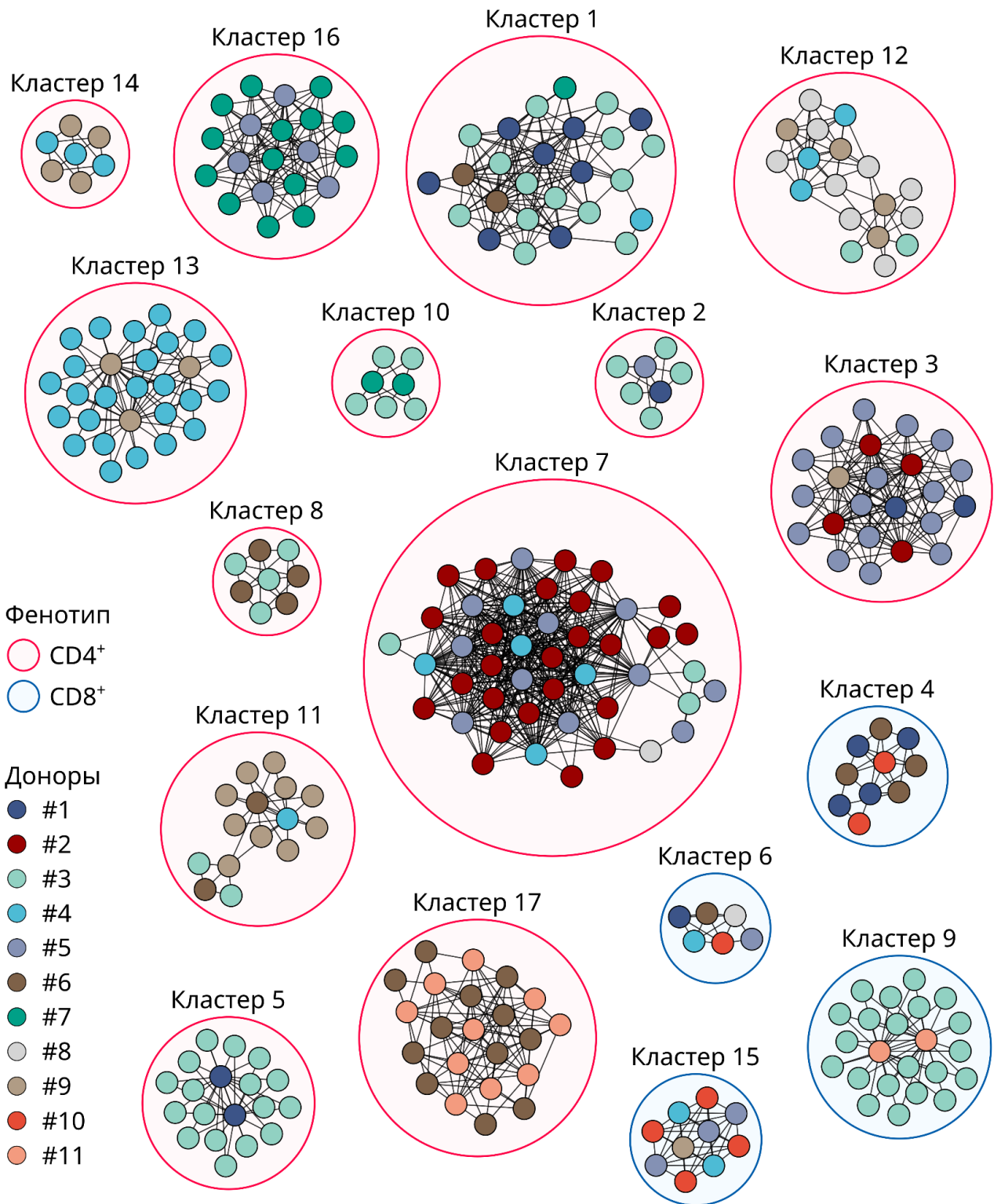


Рисунок 31. Кластеры вакцин-ассоциированных клонов разных доноров с похожими аминокислотными последовательностями β -цепей TCR (идентичные V- и J-сегменты и одинаковая длина CDR3, не более одной аминокислотной замены в CDR3), представленные в виде графа. Каждая вершина соответствует отдельному клону, клоны с похожими β -цепями TCR и от разных доноров соединены линиями. Цвет области вокруг кластеров обозначает фенотип Т-клеточных клонов в кластере: CD4⁺ (красный) или CD8⁺ (синий).

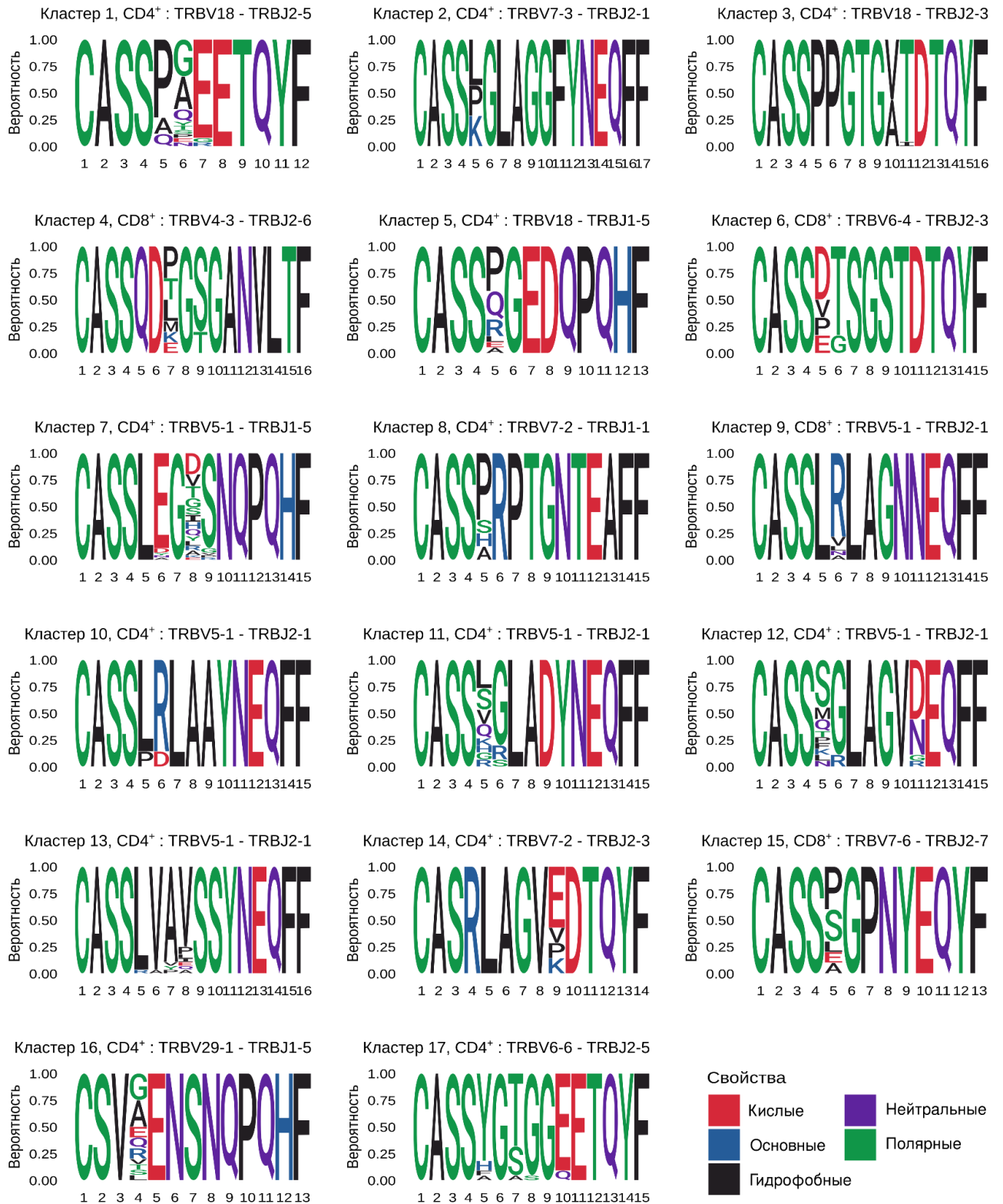


Рисунок 32. Аминокислотные мотивы CDR3 β -цепей TCR кластеризованных вакцин-ассоциированных клонов от разных доноров. Нумерация кластеров соответствует нумерации на Рисунке 31, также указан фенотип (CD4⁺ или CD8⁺) Т-клеточных клонов и комбинация VJ-сегментов. Аминокислотные остатки окрашены в соответствии с их химическими свойствами.

4.4.6. Анализ репертуаров β -цепей TCR субпопуляций *in vitro* стимулированных Т-клеток

Экспрессия CD137 и продукция $\text{IFN}\gamma$ Т-клетками в ответ на *in vitro* стимуляцию инактивированными очищенными частицами вируса КЭ могут осуществляться клетками одного и того же клона, поскольку не являются взаимоисключающими событиями. Оба маркера экспрессируются в результате активации Т-клетки: CD137 (4-1BB) способствует выживанию и усилению клеточного метаболизма Т-клеток на более поздних стадиях иммунного ответа на инфекцию, а $\text{IFN}\gamma$ участвует в непосредственном выполнении эффекторных функций Т-клеточного иммунитета [9]. По этой причине мы решили оценить пересечение репертуаров субпопуляций *in vitro* стимулированных Т-клеток доноров #5 и #6, в результате чего выделили три подмножества клонов: CD137-only, $\text{IFN}\gamma$ -only и both, найденные в репертуарах только CD137⁺ Т-клеток, только $\text{IFN}\gamma$ ⁺ Т-клеток или в обоих сразу, соответственно.

В большинстве случаев $73,3 \pm 5,9\%$ клонов из какой-либо субпопуляции принадлежали репертуарам этой же субпопуляции, за исключением клонов субпопуляции $\text{IFN}\gamma$ ⁺ Т-клеток, собранных на день 37, в которой больше половины клонов отвечали как продукцией $\text{IFN}\gamma$, так и экспрессией CD137 (Рисунок 33А). С другой стороны, значительная часть суммарной клональной численности ($62,5 \pm 14,8\%$), а значит и Т-клеток, в каждой библиотеке принадлежала клонам из подмножества “both” (Рисунок 33Б).

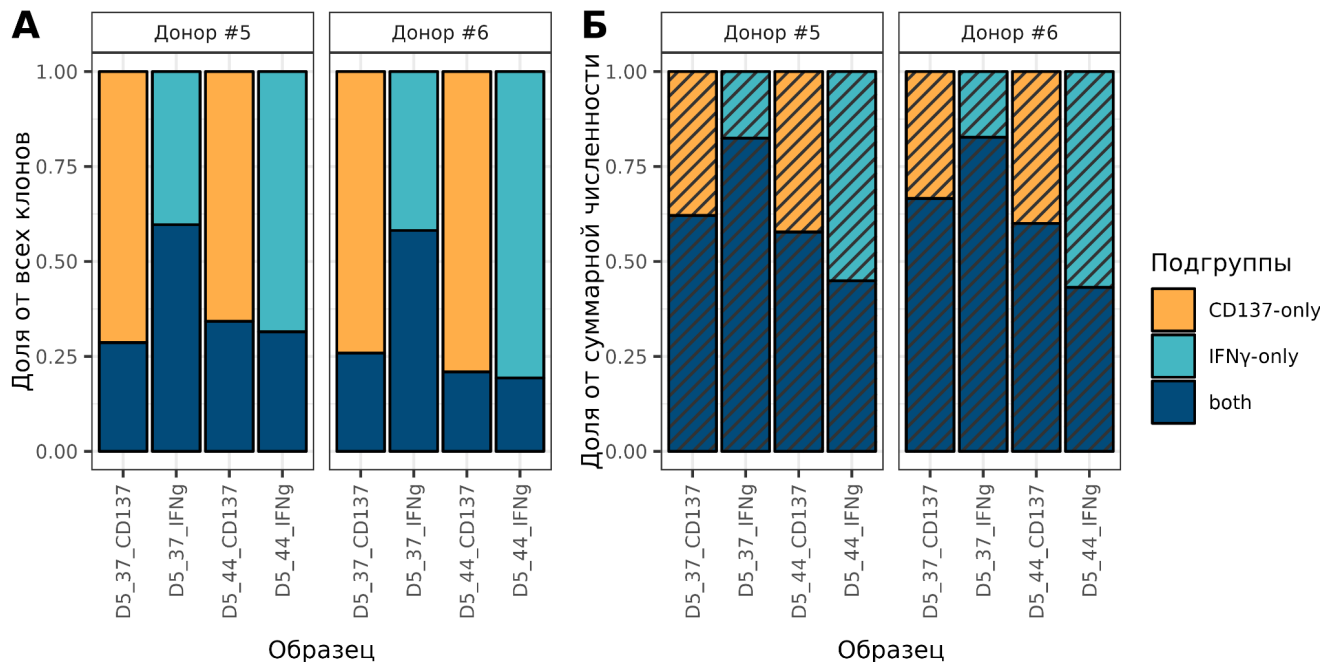


Рисунок 33. Доли клонов (А) и их суммарной численности (Б) из подмножеств “CD137-only” (жёлтый), “ $\text{IFN}\gamma$ -only” (голубой) и “both” (синий) в репертуарах субпопуляций *in vitro* стимулированных Т-клеток.

Мы также посмотрели динамику изменения представленности клонов каждого подмножества в репертуарах РВМС (Рисунок 34). Около 82% (медиана, $Q1 = 75 - Q3 = 86$) клонов из каждого репертуара *in vitro* стимулированных Т-клеток было обнаружено хотя бы один раз в репертуарах β -цепей TCR РВМС соответствующего донора. Клоны подмножества “both” занимали наибольшую долю в репертуарах РВМС во всех временных точках, а также продемонстрировали выраженную экспансию на день 37. Кроме того, подавляющее большинство клонов из подмножества “both” (87,3% и 85,5% для доноров #5 и #6, соответственно) было найдено в репертуарах $CD137^+$ и $IFN\gamma^+$ Т-клеток, полученных в один и тот же день. Таким образом, можно заключить, что Т-клетки клонов, которые *in vivo* достигают пика экспансии на день 37, также способны экспрессировать оба маркера активации в ответ на *in vitro* стимуляцию в течение двух недель после второй вакцинации (дни 37 и 44).

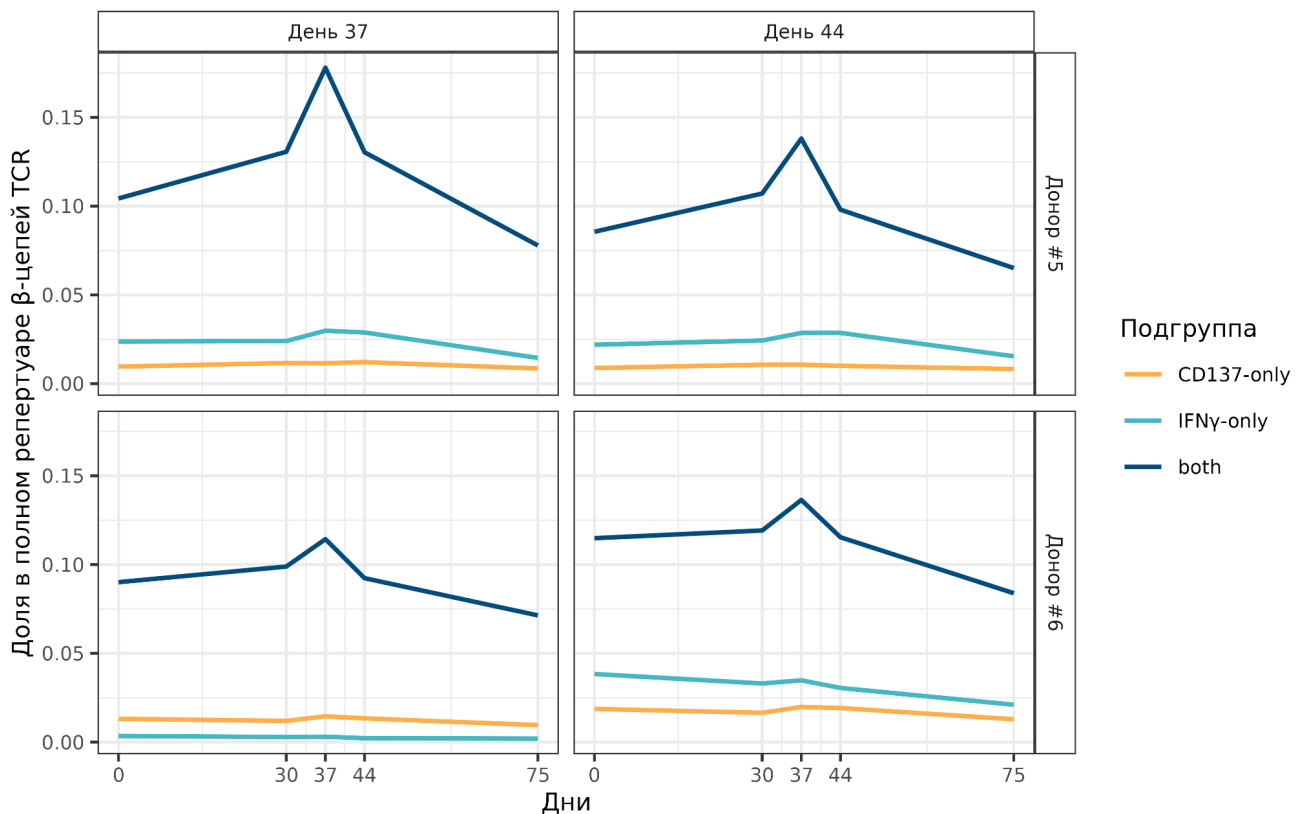


Рисунок 34. Изменение суммарной представленности подмножеств клонов “CD137-only” (жёлтый), “IFN γ -only” (голубой) и “both” (синий) в репертуаре β -цепей TCR РВМС. Представленность каждого клона рассчитывалась как среднее значение по двум репликам РВМС.

4.4.7. Сравнение транскрипционных профилей субпопуляций *in vitro* стимулированных Т-клеток

Для того, чтобы оценить функциональные различия между субпопуляциями *in vitro* стимулированных Т-клеток, мы изучили данные секвенирования тотальной РНК полученных образцов. После первичной обработки данных и реконструкции транскрипционных профилей мы оценили количество генов, экспрессия которых значимо различалась между группами образцов (англ. *differentially expressed genes*, DEGs), с помощью инструментов пакета edgeR [144,172]. При этом субпопуляции разных доноров были использованы как биологические реплики, а при сравнении было учтено сходство образцов, полученных от одного и того же донора.

Поскольку вариабельность в экспрессии генов могла быть связана не только с конкретной субпопуляцией Т-клеток (CD137⁺ или IFN γ ⁺), но и со временем проведения стимуляции (день 37 или дня 44), мы использовали обобщённую линейную модель (англ. *generalized linear model*, GLM), которая позволяет учесть воздействие нескольких факторов. Оценив дисперсию и подобрав модель, мы применили F-критерий квази-правдоподобия (англ. *quasi-likelihood F-test*, QLF) для выявления DEGs ($p < 0,01$ после коррекции методом Бенджамини-Хохберга) в четырёх вариантах сравнения групп образцов (Таблица 2).

Таблица 2. Варианты сравнения групп образцов и количество найденных DEGs.

Группа образцов	Сравнение	Количество DEGs
CD137 ⁺	День 44 vs день 37	3
IFN γ ⁺	День 44 vs день 37	3
День 37	IFN γ ⁺ vs CD137 ⁺	4
День 44	IFN γ ⁺ vs CD137 ⁺	14

По результатам анализа мы выделили 16 уникальных DEGs, большая часть которых была обнаружена при сравнении IFN γ ⁺ vs CD137⁺. Визуализация уровня экспрессии найденных DEGs с применением алгоритмов иерархической кластеризации (метод полной связи, на основе евклидовых расстояний) также показало наибольшее различие между группами образцов IFN γ ⁺ и CD137⁺ (Рисунок 35). Из этих наблюдений следует, что профили экспрессии Т-клеток из разных субпопуляций различаются в большей степени, чем профили одной и той же субпопуляции Т-клеток, полученной в разные дни.

В то же время, с помощью статистических подходов было выявлено крайне мало DEGs, что может свидетельствовать о высокой степени функционального сходства всех субпопуляций *in vitro* стимулированных Т-клеток. Также интересно отметить, что среди DEGs не представлен ген *IFNG*, кодирующий $IFN\gamma$, что позволяет сделать предположение о том, что обе субпопуляции ($CD137^+$ и $IFN\gamma^+$) Т-клеток экспрессируют этот ген на сопоставимом уровне.

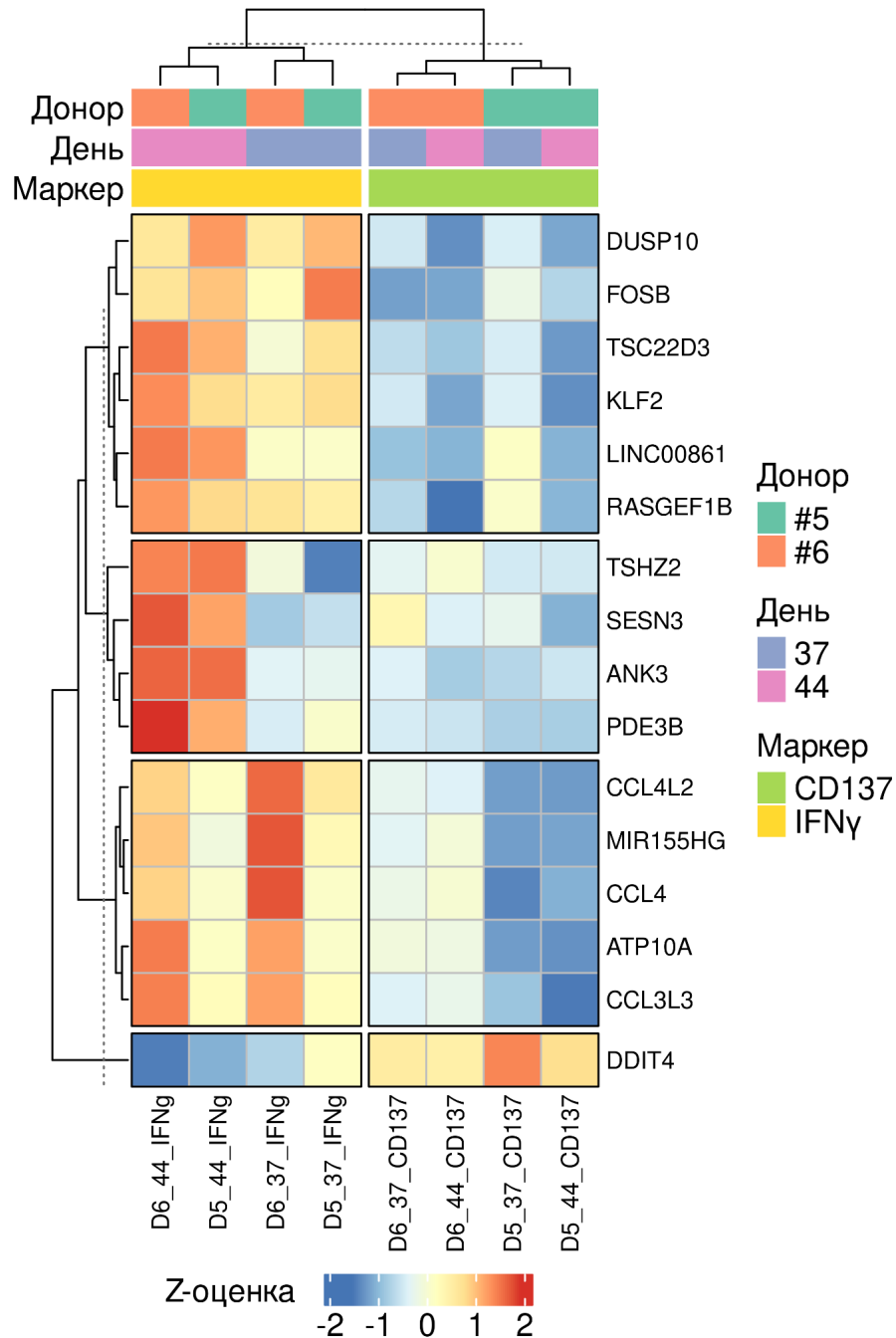


Рисунок 35. Тепловая карта экспрессии DEGs в субпопуляциях *in vitro* стимулированных Т-клеток. Цвет ячеек соответствует Z-оценке значений экспрессии в виде логарифма количества прочтений на миллион. Цветовой код над тепловой картой отражает свойства образцов: донор, день выделения Т-клеток, маркер субпопуляции.

5. Заключение

В этой работе мы впервые описали Т-клеточный ответ на вакцины против гриппа и КЭ на уровне отдельных клонов. Производство обеих вакцин основано на инактивированном вирусе, но в дальнейшем они имеют существенные различия по типу антигена, постоянству антигенного состава, протоколу иммунизации и т.д., что может приводить к разному ответу иммунной системы на каждую из вакцин. Кроме того, дополнительное влияние оказывает предыдущий опыт встречи с антигенами вируса.

Широко используемые противогриппозные субъединичные вакцины содержат только поверхностные антигены вируса гриппа разных штаммов, набор которых ежегодно меняют из-за высокой вариабельности вируса. По этой причине для регулярного обновления иммунной защиты требуется ежегодная ревакцинация, и кроме того, сам вирус гриппа постоянно присутствует в популяции. Вероятно, по этой причине нами не было обнаружено ярко выраженных изменений в репертуаре β -цепей TCR РВМС в ответ на вакцинацию против гриппа, а представленность “новых” клонов Т-клеток памяти не повышалась при последующих ревакцинациях.

Совсем иначе выглядел иммунный ответ на цельновирионную вакцину против КЭ, которая предполагает последовательное введение двух доз с интервалом в один месяц. Практически все доноры встретились с антигенами вируса КЭ впервые и поэтому продемонстрировали сильный Т-клеточный ответ. Более того, детальный клональный трекинг позволил выявить несколько волн клональной экспансии, у каждой из которых может быть своя роль в иммунном ответе. Также мы впервые показали, что вакцина против КЭ индуцирует $CD8^+$ Т-клеточный ответ, что раньше не удавалось обнаружить методами *in vitro*.

Тем не менее, несмотря на разную силу и динамику Т-клеточного ответа на вакцины, в обоих случаях удалось обнаружить новые клоны Т-клеток памяти после вакцинации. Для вакцины против КЭ обогащение репертуара Т-клеток памяти происходило после каждой иммунизации, а для противогриппозной вакцины обнаруженные клоны оставались на детектируемом уровне в течение двух последующих сезонов. Это важное наблюдение, поскольку целью любой вакцинации является формирование иммунологической памяти, которая в дальнейшем сможет обеспечить долгосрочную защиту от инфекции.

Другой не менее важный аспект иммунологической защиты – многообразие антигенов, которое могут узнавать Т-клетки. Для вакцины против КЭ мы показали, что у каждого донора образуется множество кластеров вакцин-ассоциированных клонов с похожей специфичностью TCR, что указывает на множество эпитопов, к которым был сформирован иммунный ответ.

Также мы обнаружили общие мотивы для разных доноров, которые могут указывать на клоны, специфичные к иммунодоминантным эпитопам вируса КЭ. Поиск таких эпитопов является перспективным направлением в дальнейших исследованиях, поскольку создание мультимеров с антигенами вируса КЭ позволит детальнее изучить вирус-специфичный Т-клеточный иммунный ответ.

6. Выводы

1. С помощью технологии 5'-RACE+SMART и высокопроизводительного секвенирования впервые было изучено продолжительное влияние вакцин против гриппа и клещевого энцефалита на динамику и клональное разнообразие Т-клеточного ответа.
2. По результатам анализа репертуаров β -цепей TCR была обнаружена экспансия как $CD4^+$, так и $CD8^+$ Т-клеточных клонов в ответ на каждую из вакцин, и в обоих случаях по количеству клонов и силе экспансии преобладал $CD4^+$ Т-клеточный ответ.
3. Сезонная вакцинация против гриппа привела к переходу новых клонов в субпопуляцию Т-клеток памяти и сохранению таких клонов в репертуарах β -цепей TCR в течение как минимум двух лет.
4. В ответ на вакцину против клещевого энцефалита у разных доноров была обнаружена экспансия от 302 до 1706 вакцин-ассоциированных клонов, которые суммарно занимали до 3% репертуара β -цепей TCR на пике экспансии.
5. Впервые было показано, что вакцина против клещевого энцефалита способна индуцировать $CD8^+$ Т-клеточный ответ.
6. Т-клеточный ответ на вакцину против клещевого энцефалита состоял из нескольких волн клональной экспансии, которые отличались по времени и силе экспансии, а также по скорости перехода и продолжительности сохранения в субпопуляции Т-клеток памяти.
7. В результате сравнительного анализа антиген-распознающих участков β -цепей TCR было выявлено несколько десятков кластеров для каждого донора, что может свидетельствовать о широком спектре антигенной специфичности вакцин-ассоциированных клонов.
8. Общие мотивы антиген-распознающего участка β -цепей TCR вакцин-ассоциированных клонов разных доноров, получивших вакцину против клещевого энцефалита, указывают на наличие иммунодоминантных эпитопов в составе вакцины.

7. Благодарности

Я выражаю глубокую признательность всем сотрудникам лаборатории сравнительной и функциональной геномики ИБХ РАН, которые помогли в проведении данного исследования непосредственным участием или ценным советом. Отдельно хочу поблагодарить Лебедева Юрия Борисовича за внимательное руководство, непрерывное обучение и моральную поддержку на протяжении всей работы, Комеч Екатерину Александровну за помощь в проведении сложных экспериментов и ободряющие слова, и Мамедова Ильгара Зияддиновича за помощь в подготовке образцов к секвенированию.

Также благодарю Воровича Михаила Фридриховича из ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН за предоставленный препарат инактивированных очищенных частиц вируса клещевого энцефалита для *in vitro* стимуляции и участие в обсуждении проекта.

И спасибо моей семье и близким за поддержку во всех моих начинаниях.

8. Список сокращений

5'-RACE (англ. *rapid amplification of cDNA 5' ends*) – быстрая амплификация 5'-концов кДНК

а.о. – аминокислотный остаток

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

кДНК – ДНК, комплементарная РНК

КЭ – клещевой энцефалит

мРНК – матричная РНК

нт – нуклеотид

п.о. – пара оснований

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

АРС (англ. *antigen-presenting cell*) – антигенпрезентирующая клетка

CCR7 (англ. *C-C chemokine receptor type 7*) – C-C-рецептора хемокина 7

CD (англ. *cluster of differentiation*) – кластер дифференцировки

CDR (англ. *complementarity determining region*) – участок, определяющий комплементарность

CTL (англ. *cytotoxic T lymphocyte*) – цитотоксические Т-лимфоциты

DEGs (англ. *differentially expressed genes*) – дифференциально экспрессируемые гены

dNTPs (англ. *deoxyribonucleotide triphosphates*) – дезоксирибонуклеотидтрифосфаты

HLA (англ. *human leukocyte antigen*) – лейкоцитарный антиген человека

HTS (англ. *high-throughput sequencing*) – высокопроизводительное секвенирование

IFN (англ. *interferon*) – интерферон

Ig (англ. *immunoglobulin*) – иммуноглобулин

IL (англ. *interleukin*) – интерлейкин

МНС (англ. *major histocompatibility complex*) – главный комплекс гистосовместимости

PBMCs (англ. *peripheral blood mononuclear cells*) – мононуклеарные клетки периферической крови

pMHC – комплекс пептид-МНС

SMART (англ. *switching mechanism at 5' end of RNA transcript*) – механизм переключения на 5'-конце РНК-транскрипта

TCR (англ. *T cell receptor*) – Т-клеточный рецептор

TNF (англ. *tumor necrosis factor*) – фактор некроза опухоли

UMIs (англ. *unique molecular identifiers*) – уникальный молекулярный идентификатор

9. Список литературы

1. Plotkin Stanley A. Correlates of Protection Induced by Vaccination // *Clin. Vaccine Immunol. American Society for Microbiology*, 2010. Т. 17, № 7. С. 1055–1065.
2. Ranieri E., Popescu I., Gigante M. CTL ELISPOT Assay // *Cytotoxic T-Cells: Methods and Protocols* / ed. Ranieri E. New York, NY: Springer New York, 2014. С. 75–86.
3. Flaxman A., Ewer K.J. Methods for Measuring T-Cell Memory to Vaccination: From Mouse to Man // *Vaccines (Basel)*. 2018. Т. 6, № 3.
4. Ferdinands J.M. et al. Does influenza vaccination attenuate the severity of breakthrough infections? A narrative review and recommendations for further research // *Vaccine*. 2021. Т. 39, № 28. С. 3678–3695.
5. Kubinski M. et al. Tick-Borne Encephalitis Virus: A Quest for Better Vaccines against a Virus on the Rise // *Vaccines (Basel)*. 2020. Т. 8, № 3.
6. Varnaitè R. et al. Magnitude and Functional Profile of the Human CD4+ T Cell Response throughout Primary Immunization with Tick-Borne Encephalitis Virus Vaccine // *J. Immunol*. 2020. Т. 204, № 4. С. 914–922.
7. Gomez I. et al. Characterization of tick-borne encephalitis virus-specific human T lymphocyte responses by stimulation with structural TBEV proteins expressed in a recombinant baculovirus // *Viral Immunol*. 2003. Т. 16, № 3. С. 407–414.
8. Aberle J.H. et al. Humoral and cellular immune response to RNA immunization with flavivirus replicons derived from tick-borne encephalitis virus // *J. Virol*. 2005. Т. 79, № 24. С. 15107–15113.
9. Murphy K.M., Weaver C. *Janeway's Immunobiology*. Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC, 2017. 904 p.
10. Attaf M., Huseby E., Sewell A.K. $\alpha\beta$ T cell receptors as predictors of health and disease // *Cell. Mol. Immunol*. 2015. Т. 12, № 4. С. 391–399.
11. IMGT Repertoire (IG and TR) [Электронный ресурс]. URL: <http://www.imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/> (дата обращения: 09.08.2022).
12. Ndifon W. et al. Chromatin conformation governs T-cell receptor J β gene segment usage // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2012. Т. 109, № 39. С. 15865–15870.
13. Bossen C., Mansson R., Murre C. Chromatin topology and the regulation of antigen receptor assembly // *Annu. Rev. Immunol*. 2012. Т. 30. С. 337–356.
14. Zvyagin I.V. et al. Distinctive properties of identical twins' TCR repertoires revealed by high-throughput sequencing // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. Т. 111, № 16. С. 5980–5985.

15. Livak F. et al. Genetic modulation of T cell receptor gene segment usage during somatic recombination // *J. Exp. Med.* 2000. T. 192, № 8. C. 1191–1196.
16. Yu K., Taghva A., Lieber M.R. The cleavage efficiency of the human immunoglobulin heavy chain VH elements by the RAG complex: implications for the immune repertoire // *J. Biol. Chem.* 2002. T. 277, № 7. C. 5040–5046.
17. Outters C. et al. Chapter Eight - Long-Range Control of V(D)J Recombination & Allelic Exclusion: Modeling Views // *Advances in Immunology* / ed. Murre C. Academic Press, 2015. T. 128. C. 363–413.
18. Schatz D.G., Ji Y. Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination // *Nat. Rev. Immunol.* 2011. T. 11, № 4. C. 251–263.
19. Dudley D.D. et al. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences // *Adv. Immunol.* 2005. T. 86. C. 43–112.
20. Goldrath A.W., Bevan M.J. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire // *Nature*. Nature Publishing Group, 1999. T. 402, № 6763. C. 6–13.
21. Germain R.N. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision // *Nat. Rev. Immunol.* 2002. T. 2, № 5. C. 309–322.
22. Schuldt N.J., Binstadt B.A. Dual TCR T Cells: Identity Crisis or Multitaskers? // *J. Immunol.* 2019. T. 202, № 3. C. 637–644.
23. Krangel M.S. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement // *Curr. Opin. Immunol.* 2009. T. 21, № 2. C. 133–139.
24. Jameson S.C., Hogquist K.A., Bevan M.J. Positive selection of thymocytes // *Annu. Rev. Immunol.* 1995. T. 13. C. 93–126.
25. Klein L. et al. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see) // *Nat. Rev. Immunol.* 2014. T. 14, № 6. C. 377–391.
26. Bains I. et al. Models of self-peptide sampling by developing T cells identify candidate mechanisms of thymic selection // *PLoS Comput. Biol.* 2013. T. 9, № 7. C. e1003102.
27. Wing K., Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity // *Nat. Immunol.* 2010. T. 11, № 1. C. 7–13.
28. Egerton M., Scollay R., Shortman K. Kinetics of mature T-cell development in the thymus // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990. T. 87, № 7. C. 2579–2582.
29. Shortman K., Vremec D., Egerton M. The kinetics of T cell antigen receptor expression by subgroups of CD4+8+ thymocytes: delineation of CD4+8+3(2+) thymocytes as post-selection intermediates leading to mature T cells // *J. Exp. Med.* 1991. T. 173, № 2. C. 323–332.
30. Huesmann M. et al. Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice // *Cell.* 1991. T. 66, № 3. C. 533–540.

31. Merckenschlager M. et al. How many thymocytes audition for selection? // *J. Exp. Med.* 1997. T. 186, № 7. C. 1149–1158.
32. Sinclair C. et al. Asymmetric thymocyte death underlies the CD4:CD8 T-cell ratio in the adaptive immune system // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. T. 110, № 31. C. E2905–E2914.
33. van Meerwijk J.P. et al. Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire // *J. Exp. Med.* 1997. T. 185, № 3. C. 377–383.
34. Tourne S. et al. Selection of a broad repertoire of CD4⁺ T cells in H-2Ma0/0 mice // *Immunity.* 1997. T. 7, № 2. C. 187–195.
35. Dupic T. et al. Genesis of the $\alpha\beta$ T-cell receptor // *PLoS Comput. Biol.* 2019. T. 15, № 3. C. e1006874.
36. Huang J. et al. A single peptide-major histocompatibility complex ligand triggers digital cytokine secretion in CD4(+) T cells // *Immunity.* 2013. T. 39, № 5. C. 846–857.
37. O'Donoghue G.P. et al. Direct single molecule measurement of TCR triggering by agonist pMHC in living primary T cells // *Elife.* 2013. T. 2. C. e00778.
38. Brameshuber M. et al. Monomeric TCRs drive T cell antigen recognition // *Nat. Immunol.* 2018. T. 19, № 5. C. 487–496.
39. Wieczorek M. et al. Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation // *Front. Immunol.* 2017. T. 8. C. 292.
40. Blum J.S., Wearsch P.A., Cresswell C. Pathways of antigen processing // *Annu. Rev. Immunol.* 2013. T. 31. C. 443–473.
41. Embgenbroich M., Burgdorf S. Current Concepts of Antigen Cross-Presentation // *Front. Immunol.* 2018. T. 9. C. 1643.
42. Roche P.A., Furuta K. The ins and outs of MHC class II-mediated antigen processing and presentation // *Nat. Rev. Immunol.* 2015. T. 15, № 4. C. 203–216.
43. Molecule of the month: T-cell receptor [Электронный ресурс] // RCSB: PDB-101. URL: <https://pdb101.rcsb.org/motm/63> (дата обращения: 09.12.2022).
44. Trolle T. et al. The length distribution of class I-restricted T cell epitopes is determined by both peptide supply and MHC allele-specific binding preference // *J. Immunol. The American Association of Immunologists*, 2016. T. 196, № 4. C. 1480–1487.
45. Wang C. et al. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach // *PLoS Comput. Biol.* 2008. T. 4, № 4. C. e1000048.
46. Garcia K.C. et al. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex // *Science.* 1996. T. 274, № 5285. C. 209–219.
47. Rudolph M.G., Stanfield R.L., Wilson I.A. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors // *Annu. Rev. Immunol.* 2006. T. 24. C. 419–466.

48. Rossjohn J. et al. T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules // *Annu. Rev. Immunol.* 2015. T. 33. C. 169–200.
49. Sewell A.K. Why must T cells be cross-reactive? // *Nat. Rev. Immunol.* 2012. T. 12, № 9. C. 669–677.
50. Falk K. et al. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules // *Nature.* 1991. T. 351, № 6324. C. 290–296.
51. Robinson J. et al. IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex // *Nucleic Acids Res.* 2003. T. 31, № 1. C. 311–314.
52. Welten S.P.M., Melief C.J.M., Arens R. The distinct role of T cell costimulation in antiviral immunity // *Curr. Opin. Virol.* 2013. T. 3, № 4. C. 475–482.
53. Chen L., Flies D.B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition // *Nat. Rev. Immunol.* 2013. T. 13, № 4. C. 227–242.
54. Quiel J. et al. Antigen-stimulated CD4 T-cell expansion is inversely and log-linearly related to precursor number // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. T. 108, № 8. C. 3312–3317.
55. Mayer A. et al. Regulation of T cell expansion by antigen presentation dynamics // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2019. T. 116, № 13. C. 5914–5919.
56. Zhu J., Yamane H., Paul W.E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*) // *Annu. Rev. Immunol.* 2010. T. 28. C. 445–489.
57. Hirahara K., Nakayama T. CD4⁺ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm // *Int. Immunol.* 2016. T. 28, № 4. C. 163–171.
58. Cosmi L. et al. T helper cells plasticity in inflammation // *Cytometry A.* 2014. T. 85, № 1. C. 36–42.
59. O’Shea J.J., Paul W.E. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells // *Science.* 2010. T. 327, № 5969. C. 1098–1102.
60. Mittrücker H.-W., Visekruna A., Huber M. Heterogeneity in the differentiation and function of CD8⁺ T cells // *Arch. Immunol. Ther. Exp.* . 2014. T. 62, № 6. C. 449–458.
61. Kiner E. et al. Publisher Correction: Gut CD4⁺ T cell phenotypes are a continuum molded by microbes, not by TH archetypes // *Nat. Immunol.* 2021. T. 22, № 5. C. 666–668.
62. Mahnke Y.D. et al. The who’s who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets // *Eur. J. Immunol.* 2013. T. 43, № 11. C. 2797–2809.
63. Farber D.L., Yudanin N.A., Restifo N.P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis // *Nat. Rev. Immunol.* 2014. T. 14, № 1. C. 24–35.
64. Ahmed R. et al. The precursors of memory: models and controversies // *Nat. Rev. Immunol.* 2009. T. 9, № 9. C. 662–668.
65. Hammarlund E. et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination // *Nat. Med.*

2003. Т. 9, № 9. С. 1131–1137.
66. Naniche D. et al. Decrease in measles virus-specific CD4 T cell memory in vaccinated subjects // *J. Infect. Dis.* 2004. Т. 190, № 8. С. 1387–1395.
 67. Saleh A. et al. Vaccine Development Throughout History // *Cureus.* 2021. Т. 13, № 7. С. e16635.
 68. Plotkin S.A., Plotkin S.L. The development of vaccines: how the past led to the future // *Nat. Rev. Microbiol.* 2011. Т. 9, № 12. С. 889–893.
 69. Pollard A.J., Bijker E.M. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments // *Nat. Rev. Immunol.* 2021. Т. 21, № 2. С. 83–100.
 70. Sullivan J.L. et al. Influenza virus infection in nude mice // *J. Infect. Dis.* 1976. Т. 133, № 1. С. 91–94.
 71. Osterholm M.T. et al. Efficacy and effectiveness of influenza vaccines: a systematic review and meta-analysis // *Lancet Infect. Dis.* 2012. Т. 12, № 1. С. 36–44.
 72. Попова А.Ю. et al. Влияние ежегодной иммунизации населения против гриппа на заболеваемость этой инфекцией в Российской Федерации // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* Россия, Москва: Общество с ограниченной ответственностью «Нумиком», 2016. Т. 15, № 1 (86). С. 48–55.
 73. MacLennan I.C. et al. The changing preference of T and B cells for partners as T-dependent antibody responses develop // *Immunol. Rev.* 1997. Т. 156. С. 53–66.
 74. Uchtenhagen H. et al. Efficient ex vivo analysis of CD4⁺ T-cell responses using combinatorial HLA class II tetramer staining // *Nat. Commun.* 2016. Т. 7. С. 12614.
 75. Galli G. et al. Adjuvanted H5N1 vaccine induces early CD4⁺ T cell response that predicts long-term persistence of protective antibody levels // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. Т. 106, № 10. С. 3877–3882.
 76. He X.-S. et al. Cellular immune responses in children and adults receiving inactivated or live attenuated influenza vaccines // *J. Virol.* 2006. Т. 80, № 23. С. 11756–11766.
 77. Appay V. et al. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections // *Nat. Med.* 2002. Т. 8, № 4. С. 379–385.
 78. Hamann D. et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells // *J. Exp. Med.* 1997. Т. 186, № 9. С. 1407–1418.
 79. He X.-S. et al. Phenotypic changes in influenza-specific CD8⁺ T cells after immunization of children and adults with influenza vaccines // *J. Infect. Dis.* 2008. Т. 197, № 6. С. 803–811.
 80. Hoft D.F. et al. Live and inactivated influenza vaccines induce similar humoral responses, but only live vaccines induce diverse T-cell responses in young children // *J. Infect. Dis.* 2011. Т. 204, № 6. С. 845–853.
 81. Hoft Daniel F. et al. Comparisons of the Humoral and Cellular Immune Responses Induced by

- Live Attenuated Influenza Vaccine and Inactivated Influenza Vaccine in Adults // *Clin. Vaccine Immunol.* American Society for Microbiology, 2017. T. 24, № 1. C. e00414–e00416.
82. Subbramanian R.A. et al. Pandemic and seasonal H1N1 influenza hemagglutinin-specific T cell responses elicited by seasonal influenza vaccination // *Vaccine*. 2010. T. 28, № 52. C. 8258–8267.
 83. Dolfi D.V. et al. Vaccine-induced boosting of influenza virus-specific CD4 T cells in younger and aged humans // *PLoS One*. 2013. T. 8, № 10. C. e77164.
 84. Schmidt T. et al. CD4+ T-cell immunity after pandemic influenza vaccination cross-reacts with seasonal antigens and functionally differs from active influenza infection // *Eur. J. Immunol.* 2012. T. 42, № 7. C. 1755–1766.
 85. Richards K.A. et al. Evidence That Blunted CD4 T-Cell Responses Underlie Deficient Protective Antibody Responses to Influenza Vaccines in Repeatedly Vaccinated Human Subjects // *J. Infect. Dis.* 2020. T. 222, № 2. C. 273–277.
 86. Sung M.-H. et al. Longitudinal Assessment of Immune Responses to Repeated Annual Influenza Vaccination in a Human Cohort of Adults and Teenagers // *Front. Immunol.* 2021. T. 12. C. 642791.
 87. Sugishita Y. et al. Negative effect on immune response of repeated influenza vaccination and waning effectiveness in interseason for elderly people // *Vaccine*. 2020. T. 38, № 21. C. 3759–3765.
 88. Dugan H.L., Henry C., Wilson P.C. Aging and influenza vaccine-induced immunity // *Cell. Immunol.* 2020. T. 348. C. 103998.
 89. Larbi A. et al. Impact of age on T cell signaling: a general defect or specific alterations? // *Ageing Res. Rev.* 2011. T. 10, № 3. C. 370–378.
 90. Qi Q. et al. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. T. 111, № 36. C. 13139–13144.
 91. Britanova O.V. et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling // *J. Immunol.* 2014. T. 192, № 6. C. 2689–2698.
 92. McElhaney J.E. et al. T cell responses are better correlates of vaccine protection in the elderly // *J. Immunol.* 2006. T. 176, № 10. C. 6333–6339.
 93. Nath K.D. et al. Clinical factors associated with the humoral immune response to influenza vaccination in chronic obstructive pulmonary disease // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 2014. T. 9. C. 51–56.
 94. Parmigiani A. et al. Impaired antibody response to influenza vaccine in HIV-infected and uninfected aging women is associated with immune activation and inflammation // *PLoS One*. 2013. T. 8, № 11. C. e79816.
 95. Ruzek D. et al. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical

- features, therapy, and vaccines // *Antiviral Res.* 2019. T. 164. C. 23–51.
96. Hopf S. et al. Comparable immune responsiveness but increased reactogenicity after subcutaneous versus intramuscular administration of tick borne encephalitis (TBE) vaccine // *Vaccine.* 2016. T. 34, № 17. C. 2027–2034.
97. Garner-Spitzer E. et al. Tick-borne encephalitis (TBE) and hepatitis B nonresponders feature different immunologic mechanisms in response to TBE and influenza vaccination with involvement of regulatory T and B cells and IL-10 // *J. Immunol.* 2013. T. 191, № 5. C. 2426–2436.
98. Aberle J.H. et al. Human CD4+ T Helper Cell Responses after Tick-Borne Encephalitis Vaccination and Infection // *PLoS One.* 2015. T. 10, № 10. C. e0140545.
99. Schwaiger J. et al. Specificities of human CD4+ T cell responses to an inactivated flavivirus vaccine and infection: correlation with structure and epitope prediction // *J. Virol.* 2014. T. 88, № 14. C. 7828–7842.
100. Aberle J.H. et al. Mechanistic insights into the impairment of memory B cells and antibody production in the elderly // *Age.* 2013. T. 35, № 2. C. 371–381.
101. Sangster M.Y. et al. An early CD4+ T cell-dependent immunoglobulin A response to influenza infection in the absence of key cognate T-B interactions // *J. Exp. Med.* 2003. T. 198, № 7. C. 1011–1021.
102. Litjens N.H.R., Boer K., Betjes M.G.H. Identification of circulating human antigen-reactive CD4+ FOXP3+ natural regulatory T cells // *J. Immunol.* 2012. T. 188, № 3. C. 1083–1090.
103. Blom K. et al. Specificity and dynamics of effector and memory CD8 T cell responses in human tick-borne encephalitis virus infection // *PLoS Pathog.* 2015. T. 11, № 1. C. e1004622.
104. Lampen M.H. et al. Breadth and Dynamics of HLA-A2- and HLA-B7-Restricted CD8+ T Cell Responses against Nonstructural Viral Proteins in Acute Human Tick-Borne Encephalitis Virus Infection // *Immunohorizons.* 2018. T. 2, № 6. C. 172–184.
105. Salat J. et al. Tick-Borne Encephalitis Virus Vaccines Contain Non-Structural Protein 1 Antigen and may Elicit NS1-Specific Antibody Responses in Vaccinated Individuals // *Vaccines (Basel).* 2020. T. 8, № 1.
106. Kreil T.R. et al. Vaccination against tick-borne encephalitis virus, a flavivirus, prevents disease but not infection, although viremia is undetectable // *Vaccine.* 1998. T. 16, № 11-12. C. 1083–1086.
107. Rey F.A. et al. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution // *Nature.* 1995. T. 375, № 6529. C. 291–298.
108. Dokland T. et al. West Nile virus core protein; tetramer structure and ribbon formation // *Structure.* 2004. T. 12, № 7. C. 1157–1163.

109. Robins H.S. et al. Overlap and effective size of the human CD8⁺ T cell receptor repertoire // *Sci. Transl. Med.* 2010. T. 2, № 47. C. 47ra64.
110. Warren R.L. et al. Exhaustive T-cell repertoire sequencing of human peripheral blood samples reveals signatures of antigen selection and a directly measured repertoire size of at least 1 million clonotypes // *Genome Res.* 2011. T. 21, № 5. C. 790–797.
111. Bolotin D.A. et al. Next generation sequencing for TCR repertoire profiling: platform-specific features and correction algorithms // *Eur. J. Immunol.* 2012. T. 42, № 11. C. 3073–3083.
112. Robins H.S. et al. Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells // *Blood.* 2009. T. 114, № 19. C. 4099–4107.
113. Sherwood A.M. et al. Deep sequencing of the human TCR γ and TCR β repertoires suggests that TCR β rearranges after $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell commitment // *Sci. Transl. Med.* 2011. T. 3, № 90. C. 90ra61.
114. Liu X. et al. Systematic Comparative Evaluation of Methods for Investigating the TCR β Repertoire // *PLoS One.* 2016. T. 11, № 3. C. e0152464.
115. Wang C. et al. High throughput sequencing reveals a complex pattern of dynamic interrelationships among human T cell subsets // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. T. 107, № 4. C. 1518–1523.
116. Carlson C.S. et al. Using synthetic templates to design an unbiased multiplex PCR assay // *Nat. Commun.* 2013. T. 4. C. 2680.
117. Frohman M.A., Dush M.K., Martin G.R. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988. T. 85, № 23. C. 8998–9002.
118. Fromont-Racine M. et al. A highly sensitive method for mapping the 5' termini of mRNAs // *Nucleic Acids Res.* 1993. T. 21, № 7. C. 1683–1684.
119. Matz M. et al. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press (OUP), 1999. T. 27, № 6. C. 1558–1560.
120. Schramm G., Bruchhaus I., Roeder T. A simple and reliable 5'-RACE approach // *Nucleic Acids Res.* 2000. T. 28, № 22. C. E96.
121. Scotto-Lavino E., Du G., Frohman M.A. 5' end cDNA amplification using classic RACE // *Nat. Protoc.* Nature Publishing Group, 2006. T. 1, № 6. C. 2555–2562.
122. Robins H. Immunosequencing: applications of immune repertoire deep sequencing // *Curr. Opin. Immunol.* 2013. T. 25, № 5. C. 646–652.
123. Calis J.J.A., Rosenberg B.R. Characterizing immune repertoires by high throughput sequencing: strategies and applications // *Trends Immunol.* 2014. T. 35, № 12. C. 581–590.
124. Kivioja T. et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers //

- Nat. Methods. 2011. T. 9, № 1. C. 72–74.
125. Shugay M. et al. Towards error-free profiling of immune repertoires // Nat. Methods. 2014. T. 11, № 6. C. 653–655.
126. Li S. et al. IMGT/HighV QUEST paradigm for T cell receptor IMGT clonotype diversity and next generation repertoire immunoprofiling // Nat. Commun. 2013. T. 4. C. 2333.
127. Bolotin D.A. et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling // Nat. Methods. 2015. T. 12, № 5. C. 380–381.
128. Bolotin D.A. et al. MiTCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis // Nat. Methods. 2013. T. 10, № 9. C. 813–814.
129. Thomas N. et al. Decombinator: a tool for fast, efficient gene assignment in T-cell receptor sequences using a finite state machine // Bioinformatics. 2013. T. 29, № 5. C. 542–550.
130. Ye J. et al. IgBLAST: an immunoglobulin variable domain sequence analysis tool // Nucleic Acids Res. 2013. T. 41, № Web Server issue. C. W34–W40.
131. Zhang W. et al. IMonitor: A Robust Pipeline for TCR and BCR Repertoire Analysis // Genetics. 2015. T. 201, № 2. C. 459–472.
132. Doskow J.R., Wilkinson M.F. CD3-gamma, -delta, -epsilon, -zeta, T-cell receptor-alpha and -beta transcripts are independently regulated during thymocyte ontogeny and T-cell activation // Immunology. 1992. T. 77, № 3. C. 465–468.
133. Paillard F. et al. Lymphokine mRNA and T cell multireceptor mRNA of the Ig super gene family are reciprocally modulated during human T cell activation // Eur. J. Immunol. 1988. T. 18, № 10. C. 1643–1646.
134. Egorov E.S. et al. Quantitative profiling of immune repertoires for minor lymphocyte counts using unique molecular identifiers // J. Immunol. 2015. T. 194, № 12. C. 6155–6163.
135. Oakes T. et al. Quantitative Characterization of the T Cell Receptor Repertoire of Naïve and Memory Subsets Using an Integrated Experimental and Computational Pipeline Which Is Robust, Economical, and Versatile // Front. Immunol. 2017. T. 8. C. 1267.
136. de Greef P.C. et al. The naive T-cell receptor repertoire has an extremely broad distribution of clone sizes // Elife. 2020. T. 9.
137. Miyasaka A. et al. Next-generation sequencing analysis of the human T-cell and B-cell receptor repertoire diversity before and after hepatitis B vaccination // Hum. Vaccin. Immunother. 2019. T. 15, № 11. C. 2738–2753.
138. Thapa D.R. et al. Longitudinal analysis of peripheral blood T cell receptor diversity in patients with systemic lupus erythematosus by next-generation sequencing // Arthritis Res. Ther. 2015. T. 17, № 1. C. 132.
139. Chacara W. et al. RepSeq Data Representativeness and Robustness Assessment by Shannon

- Entropy // *Front. Immunol.* 2018. T. 9. C. 1038.
140. Shifrut E. et al. CD4(+) T Cell-Receptor Repertoire Diversity is Compromised in the Spleen but Not in the Bone Marrow of Aged Mice Due to Private and Sporadic Clonal Expansions // *Front. Immunol.* 2013. T. 4. C. 379.
141. Sidhom J.-W. et al. DeepTCR is a deep learning framework for revealing sequence concepts within T-cell repertoires // *Nat. Commun.* 2021. T. 12, № 1. C. 1605.
142. Bunse L. et al. Common T-Cell-Receptor Motifs and Features in Patients with Cytomegalovirus (CMV)-Seronegative End-Stage Renal Disease Receiving a Peptide Vaccination against CMV // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. T. 23, № 3.
143. DeWitt W.S. et al. Dynamics of the cytotoxic T cell response to a model of acute viral infection // *J. Virol.* 2015. T. 89, № 8. C. 4517–4526.
144. Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data // *Bioinformatics.* 2010. T. 26, № 1. C. 139–140.
145. Minervina A.A. et al. Primary and secondary anti-viral response captured by the dynamics and phenotype of individual T cell clones // *Elife.* 2020. T. 9.
146. Pan Y.-G. et al. Vaccination reshapes the virus-specific T cell repertoire in unexposed adults // *Immunity.* 2021. T. 54, № 6. C. 1245–1256.e5.
147. Qi Q. et al. Diversification of the antigen-specific T cell receptor repertoire after varicella zoster vaccination // *Sci. Transl. Med.* 2016. T. 8, № 332. C. 332ra46.
148. Bagaev D.V. et al. VDJDdb in 2019: database extension, new analysis infrastructure and a T-cell receptor motif compendium // *Nucleic Acids Res.* 2020. T. 48, № D1. C. D1057–D1062.
149. Nolan S. et al. A large-scale database of T-cell receptor beta (TCR β) sequences and binding associations from natural and synthetic exposure to SARS-CoV-2 // *Res Sq.* 2020.
150. Dash C. et al. Quantifiable predictive features define epitope-specific T cell receptor repertoires // *Nature.* 2017. T. 547, № 7661. C. 89–93.
151. Mayer-Blackwell K. et al. TCR meta-clonotypes for biomarker discovery with tcrdist3 enabled identification of public, HLA-restricted clusters of SARS-CoV-2 TCRs // *Elife.* 2021. T. 10.
152. Huang H. et al. Analyzing the Mycobacterium tuberculosis immune response by T-cell receptor clustering with GLIPH2 and genome-wide antigen screening // *Nat. Biotechnol.* 2020. T. 38, № 10. C. 1194–1202.
153. Glanville J. et al. Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire // *Nature.* 2017. T. 547, № 7661. C. 94–98.
154. Pogorelyy M.V. et al. Detecting T cell receptors involved in immune responses from single repertoire snapshots // *PLoS Biol.* 2019. T. 17, № 6. C. e3000314.

155. Mudd P.A. et al. SARS-CoV-2 mRNA vaccination elicits a robust and persistent T follicular helper cell response in humans // *Cell*. 2022. T. 185, № 4. C. 603–613.e15.
156. Moiseenko A. et al. Estimation of the structural heterogeneity of Tick-Borne Encephalitis vaccine particles // *Microanal. Oxford Academic*, 2021. T. 27, № S1. C. 84–86.
157. Chen S. et al. AfterQC: automatic filtering, trimming, error removing and quality control for fastq data // *BMC Bioinformatics*. 2017. T. 18, № Suppl 3. C. 80.
158. Frankish A. et al. GENCODE reference annotation for the human and mouse genomes // *Nucleic Acids Res*. 2019. T. 47, № D1. C. D766–D773.
159. Dobin A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner // *Bioinformatics*. 2013. T. 29, № 1. C. 15–21.
160. Li H. et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools // *Bioinformatics*. 2009. T. 25, № 16. C. 2078–2079.
161. Mamedov I.Z. et al. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling // *Front. Immunol*. 2013. T. 4. C. 456.
162. Zvyagin I.V. et al. Tracking T-cell immune reconstitution after TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted hematopoietic cells transplantation in children // *Leukemia*. 2017. T. 31, № 5. C. 1145–1153.
163. Barennes C. et al. Benchmarking of T cell receptor repertoire profiling methods reveals large systematic biases // *Nat. Biotechnol*. 2021. T. 39, № 2. C. 236–245.
164. Pogorelyy M.V. et al. Precise tracking of vaccine-responding T cell clones reveals convergent and personalized response in identical twins // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2018. T. 115, № 50. C. 12704–12709.
165. Rochman Y., Spolski R., Leonard W.J. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines // *Nat. Rev. Immunol*. 2009. T. 9, № 7. C. 480–490.
166. Barberis M., Helikar T., Verbruggen C. Simulation of Stimulation: Cytokine Dosage and Cell Cycle Crosstalk Driving Timing-Dependent T Cell Differentiation // *Front. Physiol*. 2018. T. 9. C. 879.
167. Shyer J.A., Flavell R.A., Bailis W. Metabolic signaling in T cells // *Cell Res*. 2020. T. 30, № 8. C. 649–659.
168. Galletti G. et al. Two subsets of stem-like CD8⁺ memory T cell progenitors with distinct fate commitments in humans // *Nat. Immunol*. 2020. T. 21, № 12. C. 1552–1562.
169. Chu T., Berner J., Zehn D. Two parallel worlds of memory T cells // *Nature immunology*. 2020. T. 21, № 12. C. 1484–1485.
170. Sethna Z. et al. OLGA: fast computation of generation probabilities of B- and T-cell receptor amino acid sequences and motifs // *Bioinformatics*. 2019. T. 35, № 17. C. 2974–2981.
171. Pogorelyy M.V., Shugay M. A Framework for Annotation of Antigen Specificities in

- High-Throughput T-Cell Repertoire Sequencing Studies // *Front. Immunol.* 2019. T. 10. C. 2159.
172. McCarthy D.J., Chen Y., Smyth G.K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation // *Nucleic Acids Res.* 2012. T. 40, № 10. C. 4288–4297.

Приложения

Приложение А. Структура олигонуклеотидов, использованных при подготовке библиотек кДНК β-цепей TCR к секвенированию

Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5'-3')
BCuniR4vvshort	TGGAGTCATTGA
SMART-Mk-XXX (INDEX1)	CAGUGGUAUCAACGCAGAGUACNNNNNU(<u>INDEX1</u>)UNNNNNN UCTT(rG)
Sm1msq	GAGATCTACACGAGTCAGCAGTGGTATCAACGCAG
RP-bcj1	CGACTCAGATTGGTACACCTTGTTTCAGGTCCTC
RP-bcj2	CGACTCAGATTGGTACACGTTTTTCAGGTCCTC
Sm-out-msq	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGAGTCA
Il-bcj-YY (INDEX2)	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT(<u>INDEX2</u>)CGACTCAGATTGGT AC
NxtTRBC	TCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAACACGTTGTTTCAGG TCCTC

Приложение Б. Полный перечень библиотек с указанием количества полученных прочтений и результатов первичной обработки

Образец	Донор, #	День	Субпопуляция	Кол-во клеток	Платформа секвенирования	Кол-во прочтений	Кол-во UMIs/ суммарная численность	Кол-во клонов
Вакцинация против гриппа								
Flu_p0_F1	1	-14	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	1826196	1626360	728840
Flu_p0_F2	1	-14	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	1848920	1641647	708798
Flu_p0_NN	1	-14	Non-naïve	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1065210	967647	270131
Flu_0_F1	1	0	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	1530174	1389351	618298
Flu_0_F2	1	0	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	1673558	1519149	658045
Flu_0_NN	1	0	Non-naïve	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	971651	883978	213623
Flu_5_F1	1	5	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2982674	2697442	982847
Flu_5_F2	1	5	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3054202	2760369	1033625
Flu_5_CD4	1	5	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	1445426	1302614	660049
Flu_5_CD8	1	5	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	952047	876852	208757
Flu_12_F1	1	12	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2111020	1881640	755132
Flu_12_F2	1	12	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	1844671	1645021	672514
Flu_12_CD4	1	12	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	1700700	1516973	674113
Flu_12_CD8	1	12	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1163298	1037814	198164
Flu_45_F1	1	45	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	1468515	1308166	544566
Flu_45_F2	1	45	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	1307380	1156882	491278
Flu_45_NN	1	45	Non-naïve	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	973885	861272	184540
Flu_20m_F1	1	578	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	764961	641872	304199
Flu_20m_F2	1	578	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	738233	631458	305210
Flu_23m_F1	1	693	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	1973242	1763607	626828
Flu_23m_F2	1	693	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	1971595	1768909	630962
Flu_23m_CD4	1	693	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	2154661	1900353	784869
Flu_23m_CD8	1	693	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1696278	1486781	224409

Образец	Донор, #	День	Субпопу- ляция	Кол-во клеток	Платформа секвенирования	Кол-во прочтений	Кол-во UMIs/ суммарная численность	Кол-во клонов
Вакцинация против КЭ								
D1_p0_F1	1	-14	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4670087	506219	311333
D1_p0_F2	1	-14	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4297247	611746	362703
D1_0_F1	1	0	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1324353	172510	116340
D1_0_F2	1	0	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1464152	210223	138882
D1_0_Mem	1	0	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1248083	209672	91454
D1_30_F1	1	30	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4421908	544222	326292
D1_30_F2	1	30	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	6214084	711526	404982
D1_30_Mem	1	30	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2927291	418799	139662
D1_30_CD4	1	30	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2414949	620501	338249
D1_30_CD8	1	30	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2755405	443255	202593
D1_37_F1	1	37	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4649793	540006	332938
D1_37_F2	1	37	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4496438	600071	366911
D1_37_CD4	1	37	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2342547	607149	360279
D1_37_CD8	1	37	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2352124	462303	218108
D1_44_F1	1	44	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5337030	576990	312088
D1_44_F2	1	44	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4607411	533034	313979
D1_44_CD4	1	44	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2912222	608728	318546
D1_44_CD8	1	44	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1888603	274202	133007
D1_75_F1	1	75	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4779628	800045	429828
D1_75_F2	1	75	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1951691	514244	313764
D1_75_Mem	1	75	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	812488	230492	93742
D2_p0_F1	2	-14	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5252806	588487	289075
D2_p0_F2	2	-14	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5573935	628155	298561
D2_0_F1	2	0	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5228019	693660	305729
D2_0_F2	2	0	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5630962	790508	344615
D2_0_Mem	2	0	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	789350	225523	82859
D2_30_F1	2	30	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	3318032	635846	311363
D2_30_F2	2	30	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	3881196	660706	320322

Образец	Донор, #	День	Субпопу- ляция	Кол-во клеток	Платформа секвенирования	Кол-во прочтений	Кол-во UMIs/ суммарная численность	Кол-во клонов
D2_30_Mem	2	30	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1824513	326035	118795
D2_30_CD4	2	30	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2192388	626257	358670
D2_30_CD8	2	30	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2099273	310293	110386
D2_37_F1	2	37	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5857466	838362	327276
D2_37_F2	2	37	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5461852	743258	297143
D2_37_CD4	2	37	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2257324	474423	239511
D2_37_CD8	2	37	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1878801	472959	92648
D2_44_F1	2	44	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	3753087	1287378	468677
D2_44_F2	2	44	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5133182	1614958	551782
D2_44_CD4	2	44	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2372503	815129	382026
D2_44_CD8	2	44	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2271020	752688	181651
D2_75_F1	2	75	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4048212	903103	339754
D2_75_F2	2	75	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4646492	739299	291821
D2_75_Mem	2	75	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	803091	162282	57558
D3_p0_F1	3	-14	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4374313	712641	444729
D3_p0_F2	3	-14	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1776536	508835	347189
D3_0_F1	3	0	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	3653704	1321789	679681
D3_0_F2	3	0	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	3939319	1529970	807638
D3_0_Mem	3	0	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	3469708	1165324	224659
D3_30_F1	3	30	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5890880	794595	472484
D3_30_F2	3	30	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	7330415	666167	404577
D3_30_Mem	3	30	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2236485	377309	143749
D3_30_CD4	3	30	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1936264	404604	276573
D3_30_CD8	3	30	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2701423	539203	216784
D3_37_F1	3	37	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5272948	759950	363704
D3_37_F2	3	37	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4944461	652874	321397
D3_37_CD4	3	37	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2336544	496890	299269
D3_37_CD8	3	37	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2267191	307087	120013
D3_44_F1	3	44	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4563159	638629	372480

Образец	Донор, #	День	Субпопу- ляция	Кол-во клеток	Платформа секвенирования	Кол-во прочтений	Кол-во UMIs/ суммарная численность	Кол-во клонов
D3_44_F2	3	44	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4864674	772283	464870
D3_44_CD4	3	44	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2317627	686574	436472
D3_44_CD8	3	44	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1960349	346280	145743
D3_75_F1	3	75	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1332984	307174	224548
D3_75_F2	3	75	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1799556	406856	291752
D3_75_Mem	3	75	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	914449	87774	39795
D4_p0_F1	4	-14	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5194796	1227646	624896
D4_p0_F2	4	-14	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	6059331	1540055	859323
D4_0_F1	4	0	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4514802	1159374	650476
D4_0_F2	4	0	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1853297	679700	414249
D4_0_Mem	4	0	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1101887	308676	117698
D4_30_F1	4	30	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4525676	1220919	665648
D4_30_F2	4	30	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5826103	1412506	757459
D4_30_Mem	4	30	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2633336	717073	200481
D4_30_CD4	4	30	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2434767	908553	568985
D4_30_CD8	4	30	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2574807	745619	177070
D4_37_F1	4	37	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5263821	1037008	544164
D4_37_F2	4	37	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4809891	1077629	573448
D4_37_CD4	4	37	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2327676	716773	432862
D4_37_CD8	4	37	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1477919	277728	91907
D4_44_F1	4	44	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4669988	826606	447715
D4_44_F2	4	44	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4878074	800644	430950
D4_44_CD4	4	44	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2173164	551286	346243
D4_44_CD8	4	44	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2079771	405358	107685
D4_75_F1	4	75	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4709256	1003067	601563
D4_75_F2	4	75	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5128639	919222	559152
D4_75_Mem	4	75	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	494596	165526	78309
D5_p0_F1	5	-14	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2540610	850460	421041
D5_p0_F2	5	-14	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2252990	710948	360494

Образец	Донор, #	День	Субпопу- ляция	Кол-во клеток	Платформа секвенирования	Кол-во прочтений	Кол-во UMIs/ суммарная численность	Кол-во клонов
D5_0_F1	5	0	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	3492956	1044600	641265
D5_0_F2	5	0	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	3649206	1130672	682978
D5_0_Mem	5	0	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1905687	395407	152260
D5_30_F1	5	30	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	7536921	1142507	642342
D5_30_F2	5	30	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5991565	1149832	661101
D5_30_Mem	5	30	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1559051	296392	141715
D5_30_CD4	5	30	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2425878	758832	478235
D5_30_CD8	5	30	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1718322	423689	148326
D5_37_F1	5	37	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5175113	1303636	627572
D5_37_F2	5	37	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4415129	985369	506144
D5_37_CD4	5	37	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2370403	848614	483602
D5_37_CD8	5	37	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2118622	580989	164179
D5_37_CD137	5	37	CD137	55673	NovaSeq (2x150nt)	9714848	54480	3294
D5_37_CD137_rna_1	5	37	CD137	55673	NovaSeq (2x150nt)	72054917	-	-
D5_37_CD137_rna_2	5	37	CD137	55673	NovaSeq (2x150nt)	75104483	-	-
D5_37_IFN γ	5	37	IFN γ	11671	NovaSeq (2x150nt)	2170800	10941	1269
D5_37_IFN γ _rna_1	5	37	IFN γ	11671	NovaSeq (2x150nt)	14385065	-	-
D5_37_IFN γ _rna_2	5	37	IFN γ	11671	NovaSeq (2x150nt)	12827807	-	-
D5_44_F1	5	44	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4148878	981112	505474
D5_44_F2	5	44	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4057912	867131	455739
D5_44_CD4	5	44	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2506931	804756	421220
D5_44_CD8	5	44	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	625363	234036	78147
D5_44_CD137	5	44	CD137	21976	NovaSeq (2x150nt)	4516829	21086	1923
D5_44_CD137_rna_1	5	44	CD137	21976	NovaSeq (2x150nt)	13167163	-	-
D5_44_CD137_rna_2	5	44	CD137	21976	NovaSeq (2x150nt)	17005386	-	-
D5_44_IFN γ	5	44	IFN γ	10625	NovaSeq (2x150nt)	2255540	9656	1542
D5_44_IFN γ _rna_1	5	44	IFN γ	10625	NovaSeq (2x150nt)	7804537	-	-
D5_44_IFN γ _rna_2	5	44	IFN γ	10625	NovaSeq (2x150nt)	2305476	-	-
D5_75_F1	5	75	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1525079	394253	271493

Образец	Донор, #	День	Субпопу- ляция	Кол-во клеток	Платформа секвенирования	Кол-во прочтений	Кол-во UMIs/ суммарная численность	Кол-во клонов
D5_75_F2	5	75	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2345709	535841	341588
D5_75_Mem	5	75	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	710060	95686	43356
D6_p0_F1	6	-14	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1639037	329537	202406
D6_p0_F2	6	-14	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2292550	463678	276384
D6_0_F1	6	0	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	3323420	154689	107001
D6_0_F2	6	0	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4270589	185499	127214
D6_0_Mem	6	0	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	3449027	235886	106513
D6_30_F1	6	30	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	6272105	1114992	566915
D6_30_F2	6	30	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	6736991	874302	478104
D6_30_Mem	6	30	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1246221	218811	98436
D6_30_CD4	6	30	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1540041	537550	335379
D6_30_CD8	6	30	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1813123	441391	127073
D6_37_F1	6	37	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5214766	892723	456866
D6_37_F2	6	37	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	5941497	948618	478870
D6_37_CD4	6	37	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	2499246	628971	349918
D6_37_CD8	6	37	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1901286	270334	76670
D6_37_CD137	6	37	CD137	36195	NovaSeq (2x150nt)	7697826	35337	2212
D6_37_CD137_rna_1	6	37	CD137	36195	NovaSeq (2x150nt)	48306734	-	-
D6_37_CD137_rna_2	6	37	CD137	36195	NovaSeq (2x150nt)	35128898	-	-
D6_37_IFNg	6	37	IFN γ	10974	NovaSeq (2x150nt)	2383768	10748	487
D6_37_IFNg_rna_1	6	37	IFN γ	10974	NovaSeq (2x150nt)	8303617	-	-
D6_37_IFNg_rna_2	6	37	IFN γ	10974	NovaSeq (2x150nt)	7890855	-	-
D6_44_F1	6	44	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4195785	708250	411807
D6_44_F2	6	44	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4522425	641152	375971
D6_44_CD4	6	44	CD4	~3 млн.	NovaSeq (2x150nt)	901504	345731	240584
D6_44_CD8	6	44	CD8	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	931758	222258	78433
D6_44_CD137	6	44	CD137	45545	NovaSeq (2x150nt)	9559122	44022	3582
D6_44_CD137_rna_1	6	44	CD137	45545	NovaSeq (2x150nt)	50003708	-	-
D6_44_CD137_rna_2	6	44	CD137	45545	NovaSeq (2x150nt)	49141837	-	-

Образец	Донор, #	День	Субпопу- ляция	Кол-во клеток	Платформа секвенирования	Кол-во прочтений	Кол-во UMIs/ суммарная численность	Кол-во клонов
D6_44_IFNg	6	44	IFN γ	24658	NovaSeq (2x150nt)	4791204	22795	3489
D6_44_IFNg_rna_1	6	44	IFN γ	24658	NovaSeq (2x150nt)	22498508	-	-
D6_44_IFNg_rna_2	6	44	IFN γ	24658	NovaSeq (2x150nt)	24699098	-	-
D6_75_F1	6	75	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	3113639	888389	514562
D6_75_F2	6	75	PBMCs	~5 млн.	NovaSeq (2x150nt)	4154423	894290	514930
D6_75_Mem	6	75	CD45RO	~1 млн.	NovaSeq (2x150nt)	1827434	337724	104638
D7_0_F1	7	0	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3477809	286087	151484
D7_0_F2	7	0	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3467332	180816	102409
D7_0_Mem	7	0	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1134551	22958	16907
D7_30_F1	7	30	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	4524034	708090	304405
D7_30_F2	7	30	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	4299873	765556	325780
D7_30_Mem	7	30	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1417195	35914	23242
D7_37_F1	7	37	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3179894	39665	23681
D7_37_F2	7	37	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3698261	180039	101039
D7_37_CD4	7	37	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	2331509	689953	359280
D7_37_CD8	7	37	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1865103	120486	33939
D7_44_F1	7	44	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3889662	1224850	438946
D7_44_F2	7	44	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	4257117	1335270	479007
D7_44_Mem	7	44	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	2034136	528630	119659
D7_44_CD4	7	44	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	2195933	1105292	457925
D7_44_CD8	7	44	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	2092367	418055	88045
D7_75_F1	7	75	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3746695	904552	409527
D7_75_F2	7	75	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	4005396	901414	410722
D7_75_Mem	7	75	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	2122454	664925	207440
D7_75_CD4	7	75	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	1839214	679624	357941
D7_75_CD8	7	75	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1995958	688239	135972
D8_0_F1	8	0	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2757235	863771	439744
D8_0_F2	8	0	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3824579	905827	465906
D8_0_Mem	8	0	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1706212	649673	202014

Образец	Донор, #	День	Субпопу- ляция	Кол-во клеток	Платформа секвенирования	Кол-во прочтений	Кол-во UMIs/ суммарная численность	Кол-во клонов
D8_30_F1	8	30	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3334120	626568	353591
D8_30_F2	8	30	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3151270	563295	320922
D8_30_Mem	8	30	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1723316	483757	141119
D8_37_F1	8	37	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2963531	1028518	444908
D8_37_F2	8	37	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2945603	1204763	538551
D8_37_Mem	8	37	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1285252	191529	45924
D8_37_CD4	8	37	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	1421267	767738	405087
D8_37_CD8	8	37	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1583356	815314	167736
D8_44_F1	8	44	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3111953	899947	501898
D8_44_F2	8	44	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3074680	897904	495573
D8_44_Mem	8	44	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1704381	466436	127758
D8_44_CD4	8	44	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	1450376	618599	373509
D8_44_CD8	8	44	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1389762	550696	169649
D8_75_F1	8	75	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2689048	994711	523938
D8_75_F2	8	75	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2535393	957189	523573
D8_75_Mem	8	75	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1057580	514607	172779
D8_75_CD4	8	75	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	1141141	606259	368347
D8_75_CD8	8	75	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1152878	521262	142647
D9_0_F1	9	0	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3399364	1083158	666075
D9_0_F2	9	0	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3506906	1112994	673119
D9_0_Mem	9	0	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1447389	519964	154570
D9_30_F1	9	30	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3473047	919422	539518
D9_30_F2	9	30	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3535473	910571	527363
D9_30_Mem	9	30	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1407023	533663	122937
D9_37_F1	9	37	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3743836	640127	414315
D9_37_F2	9	37	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3417122	638089	410609
D9_37_Mem	9	37	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1234405	285141	106791
D9_37_CD4	9	37	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	1342089	428364	246314
D9_37_CD8	9	37	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1452005	311012	124154

Образец	Донор, #	День	Субпопу- ляция	Кол-во клеток	Платформа секвенирования	Кол-во прочтений	Кол-во UMIs/ суммарная численность	Кол-во клонов
D9_44_F1	9	44	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3907259	622120	400168
D9_44_F2	9	44	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3648069	621252	396071
D9_44_Mem	9	44	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1320240	335459	117904
D9_44_CD4	9	44	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	1295238	484066	279330
D9_44_CD8	9	44	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1156811	181588	76321
D9_75_F1	9	75	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3589682	691094	430576
D9_75_F2	9	75	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3386146	645811	410041
D9_75_Mem	9	75	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1391321	389845	120548
D9_75_CD4	9	75	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	1544265	595905	340623
D9_75_CD8	9	75	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1370458	379828	134205
D10_0_F1	10	0	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2526997	343336	161871
D10_0_F2	10	0	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2515134	384874	167170
D10_0_Mem	10	0	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1001642	150208	67902
D10_0_CD4	10	0	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	899021	128229	85943
D10_0_CD8	10	0	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1232746	299819	76866
D10_30_F1	10	30	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	1783507	50138	27779
D10_30_F2	10	30	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	1849873	70293	34926
D10_30_Mem	10	30	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	803567	31533	16418
D10_30_CD4	10	30	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	988001	65188	41813
D10_30_CD8	10	30	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	975569	64901	21129
D10_37_F1	10	37	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3656883	359048	199978
D10_37_F2	10	37	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	3681698	342146	190469
D10_37_Mem	10	37	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1813943	133639	67576
D10_37_CD4	10	37	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	1872858	272258	163453
D10_37_CD8	10	37	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	2070074	169041	66437
D10_44_F1	10	44	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2554575	632533	272220
D10_44_F2	10	44	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2628727	736663	297154
D10_44_CD4	10	44	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	1157440	343942	180044
D10_44_CD8	10	44	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	847970	127549	46093

Образец	Донор, #	День	Субпопу- ляция	Кол-во клеток	Платформа секвенирования	Кол-во прочтений	Кол-во UMIs/ суммарная численность	Кол-во клонов
D10_75_F1	10	75	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2896567	729544	336455
D10_75_F2	10	75	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2753263	681033	321761
D10_75_Mem	10	75	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1348876	410718	138679
D10_75_CD4	10	75	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	1000413	26055	21205
D10_75_CD8	10	75	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1317810	485193	125231
D11_0_F1	11	0	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2657500	565911	310880
D11_0_F2	11	0	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2591350	519108	275874
D11_0_Mem	11	0	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	786908	67761	36197
D11_0_CD4	11	0	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	2305823	563897	296806
D11_0_CD8	11	0	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1269999	333504	99547
D11_30_F1	11	30	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2545535	461332	279989
D11_30_F2	11	30	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2277439	240223	165503
D11_30_Mem	11	30	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1196174	313055	213399
D11_30_CD4	11	30	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	1174205	301933	210510
D11_30_CD8	11	30	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1060324	139145	70913
D11_44_F1	11	44	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2476334	458857	311331
D11_44_F2	11	44	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2651957	137874	96796
D11_44_CD4	11	44	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	1473974	469111	303343
D11_44_CD8	11	44	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1233470	233516	121143
D11_75_F1	11	75	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2704062	744865	398881
D11_75_F2	11	75	PBMCs	~5 млн.	HiSeq (2x100nt)	2915039	826880	421182
D11_75_Mem	11	75	CD45RO	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1320094	369404	123252
D11_75_CD4	11	75	CD4	~3 млн.	HiSeq (2x100nt)	1380028	485395	270826
D11_75_CD8	11	75	CD8	~1 млн.	HiSeq (2x100nt)	1215084	276334	116434

**Приложение В. Информация о донорах, участвовавших в
исследовании влияния вакцинации против КЭ на Т-клеточный
иммунитет**

Донор	Пол	Возраст	HLA-генотип
#1	М	28	A*02:01:01/A*11:01:01, B*07:02:01/B*35:03:01, C*07:02:01/C*12:03:01, DPB1*03:01:01, DQA1*03:01:01/DQA1*05:05:01, DQB1*03:01:01/DQB1*03:04:01, DRB1*04:08:01/DRB1*11:01:01, DRB3*02:02:01, DRB4*01:03:01
#2	М	32	A*01:01:01/A*25:01:01, B*18:01:01/B*57:01:01, C*06:02:01/C*12:03:01, DPB1*03:01:01/DPB1*04:01:01, DQA1*01:03:01/DQA1*05:05:01, DQB1*03:01:01/DQB1*06:03:01, DRB1*13:01:01/DRB1*13:05:01, DRB3*01:01:02/DRB3*02:02:01
#3	Ж	25	A*02:01:01/A*24:02:01, B*07:02:01/B*35:03:01, C*07:02:01/C*12:03:01, DPB1*02:01:02/DPB1*04:02:01, DQA1*03:01:01/DQA1*05:05:01, DQB1*03:01:01/DQB1*03:04:01, DRB1*04:08:01/DRB1*11:04:01, DRB3*02:02:01, DRB4*01:03:01
#4	Ж	25	A*01:01:01, B*08:01:01/B*57:01:01, C*06:02:01/C*07:01:01, DPB1*01:01:01/DPB1*05:01:01, DQA1*03:01:01/DQA1*05:01:01, DQB1*02:01:01/DQB1*03:02:01, DRB1*03:01:01/DRB1*04:02:01, DRB3*01:01:02, DRB4*01:03:01
#5	Ж	24	A*01:01:01/A*25:01:01, B*08:01:01/B*15:01:01, C*03:03:01/C*07:01:01, DPB1*03:01:01/DPB1*04:02:01, DQA1*04:01:01/DQA1*05:05:01, DQB1*03:01:01/DQB1*04:02:01, DRB1*08:01:01/DRB1*11:01:01, DRB3*02:02:01
#6	Ж	24	A*02:01:01/A*25:01:01, B*18:01:01/B*57:01:01, C*06:02:01/C*12:03:01, DPB1*02:01:02/DPB1*04:01:01, DQA1*02:01:01/DQA1*03:01:01, DQB1*03:02:01/DQB1*03:03:02, DRB1*04:01:01/DRB1*07:01:01, DRB4*01:03:01
#7	М	60	A*03:02:01/A*31:01:02, B*18, C*12/C*15, DQB1*03/DQB1*06, DRB1*11:04:01, DRB3*02:02:01
#8	Ж	54	A*24:02:01/A*01:01:01, B*52:01:01/B*40:01:02, C*03:04:01/C*12:02:02, DQB1*06:01:01/DQB1*06:02:01, DRB1*15:02:01/DRB1*15:01:01, DRB5*01:01:01/DRB5*01:02
#9	М	32	A*01/A*30:02:01, B*08/B*13:02, C*06/C*07, DQB1*02:01:01/DQB1*06:02:01, DRB1*03:01:01/DRB1*15:01:01, DRB3*01:01:02, DRB5*01:01:01,
#10	Ж	27	A*03:02:01/A*26, B*08:01/B*38:01:01, C*07/C*12, DQB1*05:03:01/DQB1*06:03:01, DRB1*13:01:01/DRB1*14:01:01, DRB3*02:02:01/DRB3*02:24
#11	Ж	26	A*01:01:01/A*25:01:01, B*08:01/B*18, C*07/C*12, DQB1*02:01:01/DQB1*03:03:02, DRB1*03:01:01/DRB1*07:01:01, DRB3*01:01:02, DRB4*01