

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

на правах рукописи

Минервина Анастасия Алексеевна
**Мониторинг адаптивного иммунного ответа человека при вакцинации
против желтой лихорадки**

специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

научный руководитель:
к.б.н. Мамедов Ильгар Зияддинович

Москва – 2020

Содержание

1. Введение.....	4
2. Обзор литературы.....	10
2.1. Формирование репертуаров Т-клеточных рецепторов.....	10
2.1.1. Белковая структура Т-клеточного рецептора и основных корецепторных молекул ...	10
2.1.2. Распознавание антигена Т-клеточным рецептором.....	12
2.1.3. Сборка гена Т-клеточного рецептора	14
2.1.4. Механистическая модель сборки Т-клеточного рецептора.....	17
2.1.5. Позитивная и негативная селекция Т-лимфоцитов	19
2.2. Изучение репертуаров Т-клеточных рецепторов с помощью высокопроизводительного секвенирования	21
2.2.1. Статистики распределения частот клонотипов	24
2.2.2. Изучение клональной динамики	26
2.2.3. Изучение распределения клонотипов в пространстве	26
2.2.4. Поиск одинаковых клонотипов у группы доноров	27
2.2.5. Изучение особенностей первичной структуры TCR.....	28
2.3. Вирус желтой лихорадки.....	29
2.3.1. Вакцина от вируса желтой лихорадки	30
2.4. Адаптивный иммунный ответ на первичную вакцинацию от вируса желтой лихорадки	31
2.4.1. Динамика клеточного ответа на вирус желтой лихорадки.....	31
2.4.2. Состав клеточного иммунного ответа на вирус желтой лихорадки	33
2.4.3. Образование Т-клеток памяти после вакцинации от желтой лихорадки	35
2.4.4. Использование методов высокопроизводительного секвенирования для изучения Т-клеточного ответа на вирус желтой лихорадки	36
2.4.5. Иммунный ответ на ревакцинацию от желтой лихорадки	38
3. Материалы и методы	39
3.1. Материалы	39
3.1.1. Использованное оборудование и расходные материалы	39
3.1.2. Использованные реактивы	39
3.1.3. Буферные растворы	40
3.2. Методы.....	41
3.2.1. Доноры и образцы крови.....	41
3.2.2. Выделение тотальной фракции РВМС	41
3.2.3. Выделение CD4 и CD8 Т-клеток	42
3.2.4. Выделение субпопуляций Т-клеток памяти.....	42
3.2.5. Выделение CD8 Т-клеток, специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса желтой лихорадки	43
3.2.6. Выделение РНК.....	44
3.2.7. Определение HLA-генотипов доноров	45
3.2.8. Приготовление библиотек кДНК α и β -цепей TCR	46
3.2.9. Секвенирование тотальной мРНК (RNAseq)	49
3.2.10. Секвенирование транскриптома и $\alpha\beta$ TCR репертуаров единичных клеток	49
3.2.11. Электрофорез и вырезание библиотек из геля.....	50
3.2.12. Очистка кДНК и ПЦР продуктов на колонках	50
3.2.13. Очистка на магнитных частицах	51
3.2.14. Первичная обработка результатов секвенирования	51
3.2.15. Анализ данных секвенирования.....	51
4. Результаты и обсуждение	53

4.1. Разработка метода HLA-типирования на основе РНК.....	53
4.1.1. Разработка системы пробоподготовки библиотек кДНК генов HLA.....	53
4.1.2. Разработка алгоритма анализа данных секвенирования для HLA-типирования	55
4.2. Мониторинг Т-клеточного иммунного ответа на первичную и вторичную вакцинацию от желтой лихорадки.....	58
4.2.1. Создание коллекции образцов и секвенирование библиотек кДНК TCR.....	58
4.2.2. Динамика ответа на первичную и вторичную вакцинацию	59
4.2.3. Ответ CD4 и CD8 клонов на вакцинацию от желтой лихорадки	60
4.2.4. Вторичная вакцинация от желтой лихорадки через 30 лет после первичной	62
4.2.5. Индивидуальная динамика ЖЛ-реактивных клонотипов.....	63
4.2.6. Слежение за индивидуальными клонотипами после первичной вакцинации.....	65
4.2.7. Идентификация изменившихся клонов на основе индивидуальных клональных траекторий	67
4.2.8. Спаривание α и β -цепей TCR на основе клональных траекторий	68
4.2.9. Изменение клеточного фенотипа в ходе вакцинации от желтой лихорадки	70
4.2.10. Сила иммунного ответа на иммунодоминантный эпитоп вируса желтой лихорадки	72
4.2.11. Анализ характеристических аминокислотных последовательностей TCR, специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса желтой лихорадки.....	75
4.2.12. Анализ парного $\alpha\beta$ TCR репертуара клонов, специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса желтой лихорадки.....	76
4.2.13. Структурное моделирование $\alpha\beta$ TCR, специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса желтой лихорадки	79
4.2.14. Анализ фенотипического разнообразия NS4B ₂₁₄₋₂₂₂ -специфических клеток через 1.5 года после вакцинации от желтой лихорадки.....	81
4.2.15. Анализ распределения клонов Т-клеток между фенотипами.....	85
4.3. Использование особенностей аминокислотных последовательностей TCR для идентификации ЖЛ-реактивных клонов	88
5. Заключение	93
6. Выводы	94
7. Благодарности	95
8. Список сокращений.....	96
9. Список литературы	97
Приложения	106
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	106
ПРИЛОЖЕНИЕ 2	109

1. Введение

Актуальность темы исследования

T-клетки играют центральную роль в адаптивном иммунном ответе, обеспечивая распознавание и уничтожение зараженных патогенами клеток, элиминацию раковых клеток, регуляцию работы остальных клеток иммунной системы, в том числе выбор высоко аффинных В-клеток. Специфичность T-клеток обеспечивается расположенными на их поверхности молекулами T-клеточного рецептора (TCR, T cell receptor), состоящими из двух цепей. Гены α и β -цепей TCR – особенные гены, поскольку не закодированы напрямую в геноме, а образуются в результате стохастического процесса V(D)J-рекомбинации. В результате этого процесса формируется крайне разнообразный репертуар TCR наивных T-клеток, которые потенциально могут распознать любой антиген.

Иммунный ответ на антиген – это комбинация нескольких процессов: клональная экспансия антиген-распознающих T-клеток, дифференцировка наивных T-клеток в другие фенотипы и сохранение части этих клонов в виде долговременной иммунной памяти, которая затем может реактивироваться при повторной встрече с этим же антигеном. Развитие современных технологий предоставляет инструменты для непосредственного изучения иммунного ответа на молекулярном уровне. Так, методы высокопроизводительного секвенирования TCR репертуаров позволяют единовременно следить за миллионами отдельных клонов T-клеток во времени и на фенотипическом ландшафте. А получившие в последние годы широкое распространение технологии секвенирования генома и транскриптома отдельных клеток позволяют связать конкретную антигенную специфичность T-клетки с фенотипом. Кроме того, в настоящее время имеется огромный набор подходов к анализу данных секвенирования репертуаров TCR, которые могут помочь охарактеризовать иммунный ответ на уровне отдельных клонов T-клеток.

Для характеристики иммунного ответа на клональном уровне с использованием описанных выше технологий необходима хорошая модель. Поскольку живая аттенуированная вакцина от желтой лихорадки (ЖЛ) является одной из самых успешных вакцин как в плане безопасности, так и в плане эффективности, она представляет собой уникальную модель контролируемой острой вирусной инфекции у человека. Первичная вакцинация от ЖЛ дает возможность проследить за активацией наивных лимфоцитов и формированием клеток памяти. Повторная же иммунизация этой вакциной – модель того, как подготовленная иммунная система борется с известным патогеном.

В настоящей работе современные технологии секвенирования TCR репертуаров и продвинутые методы биоинформатического анализа данных были использованы для

мониторинга иммунного ответа на первичную и повторную иммунизацию живой вакциной от ЖЛ.

Степень разработанности области исследования

Вакцинация против ЖЛ является одной из самых изученных моделей острой вирусной инфекции у человека. Эта вакцина представляет собой живой аттенуированный вирус, при попадании которого в организм развивается вирусемия, достигающая пика на день 7 после иммунизации. Было показано, что после иммунизации происходит сильная клональная экспансия как хелперных CD4+, так и цитотоксических CD8+ субпопуляций Т-клеток, которая достигает пика примерно через 2 недели после вакцинации. Т-клеточный ответ на вакцинацию от ЖЛ разнообразен и направлен против множества эпитопов внутри вируса. Однако сила ответа на различные пептиды существенно отличается и был описан ряд иммунодоминантных эпитопов, вызывающих особо сильный CD8 ответ. Вакцинация от желтой лихорадки приводит к формированию различных популяций Т-клеток и В-клеток памяти. На основе долговременного сохранения протективных титров антител у вакцинированных индивидов, считается, что вакцинация от желтой лихорадки приводит к пожизненной защите от заболевания.

Хотя в перечисленных исследованиях с помощью методов проточной цитометрии установлены общие характеристики первичного иммунного ответа на вакцинацию от желтой лихорадки, полученные результаты не дают представления фенотипическом и клональном разнообразии Т-клеточного ответа. В этой работе использованы современные методы секвенирования TCR репертуаров для мониторинга первичного и вторичного иммунного ответа на уровне отдельных клонов Т-клеток, отвечающих на вакцинацию от желтой лихорадки.

Цель и задачи работы

Цель работы – охарактеризовать динамику, клональный состав и антигенную специфичность Т-клеточного иммунного ответа на первичную и вторичную иммунизацию живой противовирусной вакциной. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Разработать систему пробоподготовки кДНК библиотек генов HLA I и II классов для высокопроизводительного секвенирования, а также алгоритмы биоинформатической обработки полученных данных для определения наборов аллелей HLA доноров.
2. Реконструировать TCR α и TCR β репертуары доноров в различных временных точках после вакцинации от желтой лихорадки и идентифицировать клонотипы, отвечающие на иммунизацию.
3. Провести сравнительный анализ силы и динамики Т-клеточного иммунного ответа на первичную и повторную вакцинацию от желтой лихорадки.

4. Определить принадлежность ЖЛ-реактивных клонов Т-лимфоцитов к различным субпопуляциям клеток памяти, формирующихся после иммунизации от желтой лихорадки.
5. Выявить характеристические мотивы в аминокислотных последовательностях TCR α и TCR β , специфичных к иммунодоминантному эпитопу NS4B₂₁₄₋₂₂₂ вируса желтой лихорадки.

Научная новизна

В этой работе использовано высокопроизводительное секвенирование репертуаров α и β -цепей TCR различных субпопуляций Т-клеток в последовательных временных точках после первичной и вторичной вакцинации от желтой лихорадки. Впервые было показано, что ответ на повторную иммунизацию живой противовирусной вакциной вызывает на порядок более слабый, но быстро развивающийся Т-клеточный ответ. Параллельный анализ TCR α и TCR β репертуаров показал высокую воспроизводимость в репертуарах α и β -цепей TCR, что позволило разработать оригинальный биоинформатический алгоритм для спаривания α и β -цепей TCR на основе схожести клональных траекторий.

Впервые с помощью высокопроизводительного секвенирования репертуаров TCR клеток памяти была показана смена фенотипа клонов цитотоксических лимфоцитов, отвечающих на вирус желтой лихорадки из эффекторной памяти (EM) в терминально-дифференцированную эффекторную память (EMRA). С помощью секвенирования транскриптомов отдельных цитотоксических Т-клеток, специфичных к вирусу желтой лихорадки, через 18 месяцев после вакцинации описаны два типа клеток памяти, один из которых характеризуется высоким цитотоксическим потенциалом, а другой имеет маркеры долгоживущих клеток памяти.

В ходе выполнения работы получена самая большая база α и β -цепей TCR специфичных к иммунодоминантному пептиду LLWNGPMAV из белка NS4B вируса желтой лихорадки. С использованием секвенирования транскриптомов отдельных клеток восстановлены парные $\alpha\beta$ TCR, распознающие NS4B₂₁₄₋₂₂₂, и описаны два различных структурных решения к связыванию этого эпитопа.

Разработан оригинальный подход к поиску в TCR репертуарах тех клонов, которые активно участвующих в иммунном ответе, основанный на использовании особенностей первичной структуры TCR и статистических моделей сборки генов TCR. В отличие от существующих подходов, основанных на применении окрашивания МНС-мультимерами или выделении активированных клеток, предложенная стратегия поиска клонов не предполагает наличия знаний о природе антигена, иммунодоминантных эпитопах и особенностях активации клеток.

Практическая значимость

Основные научные результаты, полученные при анализе TCR репертуаров доноров до и после вакцинации живой противовирусной вакциной, способствуют накоплению знаний о поведении отдельных клонов Т-клеток в острой и отложенной фазах иммунного ответа. Такие знания важны для понимания того, какие факторы приводят к формированию долговременной иммунной памяти, которая способна защищать организм от вируса через многие годы после вакцинации. В отличие от ЖЛ, другая флавивирусная инфекция – лихорадка Денге все еще является крайне острой проблемой в Юго-Восточной Азии и Южной Америке, и главная причина этого – отсутствие хорошей вакцины. Глубокое понимание основ противовирусного иммунитета, в том числе полученное путем секвенирования TCR репертуаров, будет способствовать разработке новых современных вакцин.

Разработанные подходы к идентификации участвующих в иммунном ответе клонов Т-клеток могут быть применены для мониторинга Т-клеточного ответа не только на вакцинацию, но и другие стимулы, приводящие к сильной клональной экспансии, такие как инфекция, аутоиммунные заболевания и иммунотерапия.

Явление иммунодоминантности отдельных эпитопов внутри сложных антигенов в настоящее время вызывает большой интерес в связи с развитием методов индивидуальной иммунотерапии опухолей. Основным этапом направленной иммунотерапии опухолей является идентификация неоантигенов, иммуногенных пептидов экспрессируемых клетками опухоли. Проблема заключается в том, что среди множества обнаруженных неоантигенных пептидов лишь немногие будут вызывать сильный иммунный ответ. В настоящий момент нет хорошего объяснения этому явлению, но предполагается что сила ответа на конкретный антиген может определяться разнообразием Т-клеточного репертуара распознающих его наивных клеток. Таким образом, изучение особенностей репертуаров TCR, распознающих иммунодоминантные пептиды, имеет не только фундаментальное, но и важное практическое значение.

Разработанная в ходе выполнения исследования система HLA-типирования может непосредственно использоваться на практике для поиска у доноров аллелей HLA ассоциированных с заболеваниями (болезнь Бехтерева, ревматоидный артрит, сахарный диабет 1 типа, псориаз, Болезнь Крона и т.д.). Кроме того, наличие недорогой, простой и точной системы HLA-типирования в руках исследователя поможет при формировании когорт для работ по поиску клонов TCR, ассоциированных с заболеваниями, и при подборе доноров для использования МНС-мультимеров.

Апробация работы и публикации

Основные результаты диссертации были представлены на 6 международных конференциях: Next Gen Immunology, Реховот, Израиль, 11–14 февраля 2018; European Congress Immunology, Амстердам, Нидерланды, 2–5 сентября 2018; Physical concepts and computational models in immunology, Париж, Франция, 26–28 сентября 2018; Stochasticity and Control in Adaptive Immune Repertoires, Париж, Франция, 28–31 октября 2018, в том числе в виде устных докладов на конференциях Tumors and Immune Systems: From Theory to Therapy, Каржез, Франция, 15–19 апреля 2019 и From Molecular Basis to Predictability and Control of Evolution, Стокгольм, Швеция, 1–26 июля 2019.

По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science.

Статьи

1. Pogorelyy MV, **Minervina AA**, Chudakov DM, Mamedov IZ, Lebedev YB, Mora T, Walczak AM Method for identification of condition-associated public antigen receptor sequences. // *Elife*. 2018. Т. 7. С. 1–12.
2. Pogorelyy MV, **Minervina AA**, Touzel MP, Sycheva AL, Komech EA, Kovalenko EI, Karganova GG, Egorov ES, Komkov AY, Chudakov DM, Mamedov IZ, Mora T, Walczak AM, Lebedev YB; Precise tracking of vaccine-responding T cell clones reveals convergent and personalized response in identical twins // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018. Т. 115. № 50. С. 12704–12709.
3. Pogorelyy MV*, **Minervina AA***, Shugay M, Chudakov DM, Lebedev YB, Mora T, Walczak AM; Detecting T cell receptors involved in immune responses from single repertoire snapshots // *PLoS Biol*. 2019. Т. 17. № 6. С. e3000314., * - равный вклад
4. **Minervina AA**, Pogorelyy MV, Mamedov IZ; T-cell receptor and B-cell receptor repertoire profiling in adaptive immunity // *Transpl Int*. 2019. Т. 32. № 11. С. 1111–1123.
5. **Minervina AA**, Pogorelyy MV, Komech EA, Karnaukhov VK, Bacher P, Rosati E, Franke A, Chudakov DM, Mamedov IZ, Lebedev YB, Mora T, Walczak AM; Primary and secondary anti-viral response captured by the dynamics and phenotype of individual T cell clones // *eLife*. 2020. Т. 9. С. e53704

Тезисы докладов на конференциях

1. RNA-based high-resolution HLA typing system
Minervina AA, Pogorelyy MV, Komech EA, Spektor MS, Lebedev YB, Mamedov IZ, Open-source, Next Gen immunology, Rehovot, Israel, February 11-14, 2018
2. High throughput sequencing of TCR repertoire after yellow fever revaccination

- Minervina AA**, Pogorelyy MV, Komech EA, Mamedov IZ, Lebedev YB, European Congress Immunology, Amsterdam, Netherlands, September 2-5, 2018, Abstract book pp. 514-515
3. Alterations in TCR repertoire after yellow fever revaccination
Minervina AA, Pogorelyy MV, Komech EA, Mamedov IZ, Mora T, Walczak AM, Lebedev YB, Physical concepts and computational models in immunology, ENS, Paris, France, September 26-28, 2018
 4. Alterations in TCR repertoire after yellow fever revaccination
Minervina AA, Pogorelyy MV, Komech EA, Mamedov IZ, Mora T, Walczak AM, Lebedev YB, Stochasticity and Control in Adaptive Immune Repertoires, Paris, France, October 28-31, 2018
 5. TCR repertoire sequencing reveals diverse individual trajectories of clonotypes responding to yellow fever vaccination
Minervina AA, Tumors and Immune Systems: From Theory to Therapy, Cargese, France, April 15-19, 2019
 6. Alterations in TCR repertoire after yellow fever vaccination and revaccination
Minervina AA, From Molecular Basis to Predictability and Control of Evolution, Nordita, Stockholm, Sweden, July 1-26, 2019

2. Обзор литературы

Т-клеточный рецептор играет центральную роль в системе адаптивного иммунитета, где определяет выбор стратегии борьбы с патогенами, обеспечивает защиту организма от аутоиммунных реакций и отбор специфичных к чужеродным антигенам В-клеточных рецепторов. В первой главе этого обзора будет описана структура Т-клеточного рецептора, принципы распознавания антигенов Т-клетками, а также формирование разнообразия рецепторов в процессе V(D)J-рекомбинации и селекции. Во-второй главе будут рассмотрены основные методы получения библиотек цепей Т-клеточных рецепторов и принципиальные подходы к анализу репертуаров Т-клеточных рецепторов. В-третьей главе будет описано строение и эпидемиология вируса желтой лихорадки. В заключительной части обзора будет рассмотрено, как работает разнообразие Т-клеточных рецепторов в ответ на острую инфекцию на примере вакцинации от ЖЛ.

2.1. Формирование репертуаров Т-клеточных рецепторов

Способность к специфическому узнаванию антигенов – отличительная особенность клеток адаптивного иммунитета. Распознавание антигенов происходит за счет их взаимодействия с Т- или В-клеточными рецепторами на поверхности лимфоцитов. Структура антиген-распознающих рецепторов определяет возможность связывания с различными пептидами и должна быть вариабельна, чтобы обеспечивать узнавание большого спектра природных антигенов. Совокупность различных по структуре рецепторов принято называть репертуаром. Репертуар В- и Т-клеточных рецепторов формируется в процессе соматической V(D)J-рекомбинации, а также дальнейшей селекции клеток. Молекулярная основа, позволяющая сформировать огромное количество функционально различных иммунных клеток была открыта в 1983 году японским ученым Судзуми Тонегавой [Tonegawa, 1983], удостоенным за это Нобелевской премии.

2.1.1. Белковая структура Т-клеточного рецептора и основных корцепторных молекул

Т-клеточный рецептор (TCR) представляет собой мембранный белковый гетеродимер, состоящий из двух цепей [Davis, Bjorkman, 1988]. Большинство Т-лимфоцитов имеют TCR состоящий из α - и β -цепей (Рисунок 1), связанных между собой дисульфидной связью. Помимо

$\alpha\beta$ Т-лимфоцитов в организме также имеется небольшое количество $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. Распознавание антигенов и функциональные особенности $\gamma\delta$ Т-лимфоцитами отличаются от $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов и активно изучаются [Adams, Gu, Luoma, 2015; Kabelitz, Déchanet-Merville, 2015; Silva-Santos, Strid, 2017]. В дальнейшем речь пойдет о классических $\alpha\beta$ TCR.

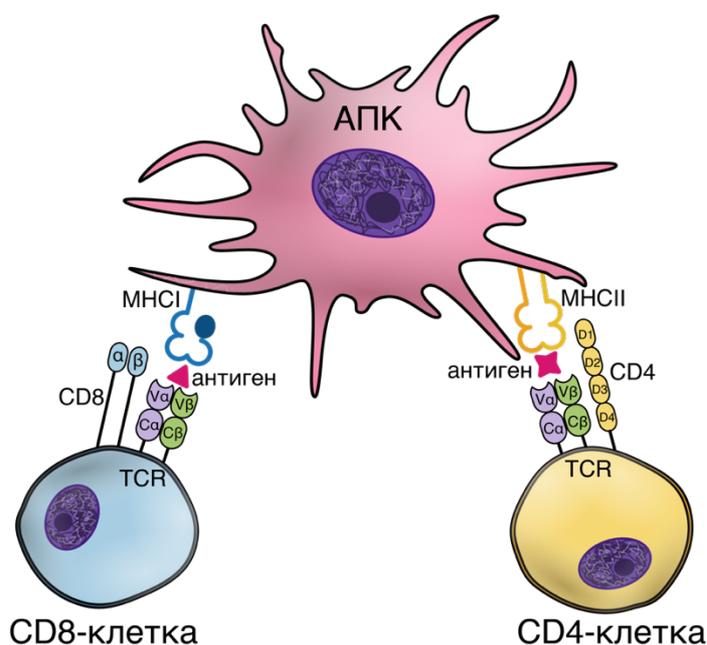


Рисунок 1. Схема взаимодействия между антигенпрезентирующими клетками (АПК) и CD4 (справа) и CD8 клетками (слева). CD8 клетки распознают антиген в комплексе с MHC I при участии TCR и корецептора CD8. CD4 клетки распознают антиген в комплексе с MHC II при участии TCR и корецептора CD4. TCR представляет собой гетеродимер из α - и β -цепи, каждая из которых имеет константный (C) и переменный (V) домены. Молекула CD8 представляет собой гетеродимер из α - и β -цепей, состоящих из одного иммуноглобулинового домена. Молекула CD4 – единый полипротеин из четырех иммуноглобулиновых доменов.

Каждая из цепей TCR имеет по два иммуноглобулиновых домена: переменный V домен, находящийся на N-конце молекулы, и константный C домен, расположенный на C-конце. α - и β -цепи также содержат трансмембранный участок и короткий C-концевой цитоплазматический конец. Т-клеточный рецептор имеет один антигенсвязывающий участок, находящийся на N-конце. В распознавании антигена принимают участие обе цепи TCR [Dash и др., 2017; Glanville и др., 2017; Song и др., 2017].

Помимо TCR важную роль в узнавании лиганда принимают молекулы CD4 и CD8, называемые корецепторами Т-клеток [Murphy, Weaver, 2016]. CD4 представляет собой единую

полипептидную цепь с четырьмя иммуноглобулиновыми доменами (Рисунок 1). CD8 – это гетеродимер из α - и β -цепи, связанных дисульфидной связью. Каждая из цепей CD8 имеет по одному иммуноглобулиновому домену. Эти молекулы экспрессируются на функционально различных клетках: CD8 является маркером цитотоксических Т-лимфоцитов, а CD4 корцептором Т-хелперов [Cantor, Boyse, 1975; Kisielow и др., 1975]. Рецепторы CD4 и CD8 не взаимодействуют непосредственно с антигеном, а обеспечивают связывание TCR с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС).

2.1.2. Распознавание антигена Т-клеточным рецептором

Распознавание антигенов TCR существенно отличается от взаимодействия антител и В-клеточных рецепторов (BCR) с белками. BCR узнают интактный антиген, то есть связывают доступный эпитоп на поверхности молекулы, причем этот участок может состоять из аминокислотных остатков находящихся на разных участках полипептидной цепи, но при этом сближенных в свернутом белке [Murphy, Weaver, 2016]. TCR наоборот узнают небольшой пептид в составе антигена, чаще всего находящийся в глубине белковой глобулы. Для того, чтобы TCR мог связаться со своим антигеном, белок должен быть предварительно разрезан на короткие пептиды и представлен на молекулах главного комплекса гистосовместимости (МНС) [Townsend и др., 1986; Zinkernagel, Doherty, 1974].

Молекулы МНС делятся на два класса, отличающихся как по структуре, так и по функциям [Murphy, Weaver, 2016]. Молекулы МНС I класса состоят из двух полипептидных цепей: α -цепи и нековалентно связанного с ней β_2 -микроглобулина, которые формируют четыре домена (Рисунок 1). Дистально расположенные к мембране домены α_1 и α_2 формируют антигенсвязывающую бороздку. МНС II класса представляет собой гетеродимер из двух полипептидных цепей α и β , обе из которых пронизывают мембрану [Davis, Bjorkman, 1988]. Также, как и у МНС I класса в составе молекулы II класса имеется четыре домена, два из которых (α_1 и β_1) образуют участок для связывания пептидов. Антигенсвязывающая бороздка в составе МНС обоих классов имеет схожую структуру, в которой пептид зажат между двумя α -спиральными участками [Khan, Ranganathan, 2011]. Главное отличие состоит в том, что концевые участки бороздки МНС II класса несколько шире, чем у МНС I класса, что позволяет связывать более длинные пептиды. Действительно, МНС I класса в основном связывает пептиды длиной 8-10 а.о [Gfeller и др., 2018], в то время как МНС II класса обычно взаимодействует с пептидами длиной от 13 до 25 а.о. [Wang и др., 2008]. Связывание пептида является определяющим в стабилизации структуры молекул МНС, поэтому все комплексы на поверхности клетки имеют в своем составе пептид [Simon и др., 2000]. Кроме того, такая

структурная зависимость делает практически невозможным обмен пептидов на зрелом комплексе МНС *in vivo*. Однако ученым удалось разработать протокол, позволяющий в условиях *in vitro* помещать в имеющийся комплекс МНС I класса интересующий пептид путем обмена с помощью ультрафиолета [Rodenko и др., 2006]. Для этого в комплекс сначала помещают специальный пептид, который расщепляется под действием ультрафиолета. При расщеплении пептида комплекс МНС очень нестабилен и легко связывает другой пептид, находящийся в растворе.

Для того чтобы обеспечить презентацию всех возможных чужеродных антигенов Т-клеткам, молекулы МНС должны иметь возможность связывать огромное количество пептидов. Это становится возможным благодаря наличию разных МНС у одного человека и большому количеству аллельных вариантов МНС в человеческой популяции. Молекулы главного комплекса гистосовместимости кодируются генами HLA – самыми полиморфными генами в организме человека. В настоящее время известно более 6000 аллелей первого класса и около 2000 аллелей второго класса [Robinson и др., 2013], причем новые аллели открываются каждый год. МНС I класса кодируются тремя генами *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, а α и β -цепи МНС II класса генами *HLA-DR*, *HLA-DQ*, *HLA-DP*. Таким образом, каждый человек может иметь до 10 различных молекул МНС II класса и до 6 молекул МНС I класса. Вариабельность между различными аллельными вариантами HLA генов сосредоточена в месте, кодирующем антигенсвязывающую бороздку молекул МНС [Robinson и др., 2017]. Таким образом, за счет наличия большого количества различных вариаций МНС как внутри одного человека, так и во всей человеческой популяции обеспечивается презентация невероятного разнообразия антигенов Т-клеткам. Более того, каждый конкретный вариант МНС будет представлять свой собственный спектр пептидов [Sidney и др., 2008]. В настоящее время существует довольно большое количество алгоритмов, позволяющих с высокой точностью предсказать связывание пептида с МНС I класса [Andreatta, Nielsen, 2016; Nielsen и др., 2005; Nielsen, Andreatta, 2017]. Для МНС II класса такие программы работают хуже, поскольку этот комплекс может связывать пептиды очень разной длины, что слабо поддается моделированию. Кроме того, сильное связывание пептида с МНС еще не означает, что пептид действительно будет презентироваться клеткой, поскольку это зависит от множества факторов, включающих уровень экспрессии, возможность появления такого пептида при разрезании белка протеасомой, особенности работы клеточных транспортеров и стабильности комплекса пептид-МНС (pMHC). В ближайшем будущем все эти алгоритмы будут активно развиваться, поскольку стоит проблема предсказания лучших неоантигенов в персонализированной иммунотерапии опухолей [Mösch и др., 2019].

МНС I и II класса отличаются не только по спектру представляемых пептидов, но и функционально. Основная задача МНС I класса – это представление внутриклеточных пептидов CD8 Т-лимфоцитам. Если зрелый CD8 Т-лимфоцит узнает антиген в контексте МНС I (Рисунок 1), происходит его активация, следствием которой является уничтожение зараженных клеток. Таким образом, именно цитотоксическим клеткам принадлежит центральная роль в элиминации вирусных инфекций. Поскольку вирус может размножаться в любых ядродержащих клетках организма, возможность сигнализировать посредством МНС I о внутриклеточной инфекции должна быть у всех клеток. Именно поэтому МНС I класса присутствуют на всех ядерных клетках организма [Murphy, Weaver, 2016]. В отличие от МНС I класса, молекулы МНС II класса экспрессируются только на специализированных клетках: дендритных клетках, макрофагах и В-лимфоцитах. Эти клетки часто называют антигенпрезентирующими (АПК), так как их основная функция – представление внеклеточных антигенов наивным Т-клеткам (Рисунок 1). АПК захватывают антигены извне, процессируют их внутри клетки и выставляют на поверхность в комплексе с МНС II класса. Узнавание рМНС Т-хелперами не вызывает гибели АПК, а приводит к выбросу различных цитокинов и активации других клеток иммунной системы.

Со стороны Т-клеток в распознавании комплекса рМНС принимает участие две молекулы. Корецепторные молекулы CD4 и CD8 обеспечивают взаимодействие с определенным видом МНС и увеличивает сродство TCR к антигену [Murphy, Weaver, 2016]. Со стороны TCR связывание молекул МНС происходит в основном участками CDR1 и CDR2, а связывание пептида – в основном участком CDR3 [Khan, Ranganathan, 2011]. Нуклеотидные последовательности CDR1 и CDR2 полностью закодированы в V-сегменте, в то время как CDR3 образуется на стыке сегментов в процессе перестройки геномных локусов α - (TRA) и β -цепей (TRB) TCR [Kraegel, 2009].

2.1.3. Сборка гена Т-клеточного рецептора

Локусы TRA и TRB расположены на 7 и 14 хромосоме соответственно. Оба этих локуса состоят из большого количества геномных сегментов: V (variable), J (joining) и C (constant). TRA содержит 54 V-сегмента, 61 J-сегмент и единственный C-сегмент (Рисунок 2A). Внутри локуса TRA также расположен локус кодирующий δ -цепи $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов [Davis, Bjorkman, 1988]. Посредством такого расположения осуществляется однозначное определение линии развития конкретной Т-клетки: перестройка TRA локуса делает невозможным формирование функциональной δ -цепи и приводит к дифференцировке в $\alpha\beta$ Т-лимфоцит.

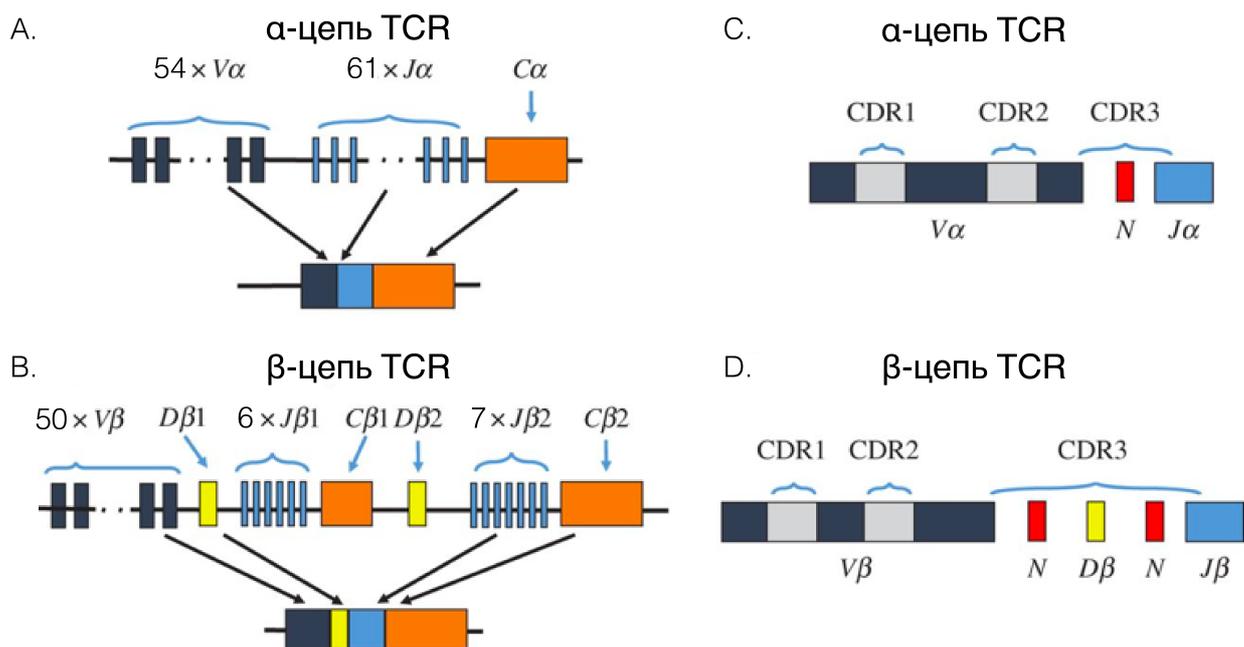


Рис. 2. Структура локусов *TRA* и *TRB* человека (цит. по [Laydon, Bangham, Asquith, 2015] с изменениями). **A** и **B**: схематическая организация неперестроенных и перестроенных локусов генов α - и β -цепей TCR. Число рядом с названием сегмента – количество функциональных сегментов такого типа в геноме. **C** и **D**: организация CDR1, CDR2 и CDR3 в перестроенном локусе. Сегменты на рисунке помечены разными цветами: V-синий, D-желтый, J-голубой, C-оранжевый. Случайные вставочные нуклеотиды (N) обозначены красным цветом.

Локус *TRB* состоит из 50 V-сегментов, 13 J-сегментов, между которыми расположены дополнительные 2 D (diversity) сегмента, отсутствующие в *TRA* локусе, и двух C-сегментов (Рисунок 2B). Геномные локусы зрелых Т-лимфоцитов имеют структуры VJ для α -цепи или VDJ для β -цепи (Рисунок 2).

Перестройка геномных локусов цепей Т-клеточного рецептора осуществляется специальными рекомбиназами RAG, а также белками клеточной системы репарации [Bassing, Swat, Alt, 2002]. Рекомбинация направляется специальными последовательностями RSS (recombination signal sequence), фланкирующими все сегменты в составе локусов. RSS представляют собой консервативные последовательности из гептамера CACAGTG, нонамера ACAAAAACC и спейсера длиной 12 или 23 нт между ними. Рекомбинация может происходить только между участками RSS с разными спейсерами (“правило 12/23”). RSS с длиной спейсера 23 находятся на 3'-конце V-сегментов, а 12-RSS на 5' J-сегментов. Таким образом, “правило 12/23” обеспечивает правильное направление рекомбинации, позволяющее соединить V-

сегменты с J -сегментами, но не между собой. Процесс рекомбинации TRB локуса усложняется наличием D -сегментов, которые содержат 12-RSS на 5'-конце и 23-RSS на 3'-конце. Правильная перестройка β -цепи TCR полностью не объясняется моделью 12/23, поскольку она не запрещает соединение TRBV и TRBJ сегментов напрямую (без D сегментов), однако в реальности этого не происходит.

В процессе V(D)J-рекомбинации на стыке сегментов происходит также удаление и вставка случайного количества нуклеотидов. Посчитано, что наличие вставочных букв в месте соединения сегментов отвечает за 60% разнообразия T-клеточного репертуара [Muguan и др., 2012]. Именно в месте соединения геномных сегментов расположены последовательности CDR3 α - и β -цепей TCR, непосредственно отвечающие за узнавание антигенного пептида в бороздке MHC (Рисунок 2 С, D).

Случайность при перестройке генов T-клеточных рецепторов с одной стороны является основой для формирования широкого спектра антиген-распознающих рецепторов, но с другой стороны не может обеспечить постоянную сборку функциональных молекул. Делеции и вставки случайных нуклеотидов в 2/3 случаев приводят к сдвигу рамки считывания, велика вероятность образования преждевременных стоп-кодонов внутри нуклеотидной последовательности CDR3. Кроме того, среди генов сегментов TRA и TRB имеются псевдогены, участвующие в рекомбинации, но не приводящие к экспрессии функциональных цепей рецептора. Очевидно, что должна существовать система тонкой временной регуляции, позволяющая получить T-клетки с функциональным $\alpha\beta$ TCR.

Процесс формирования T-клеточного рецептора начинается с перестройки локуса TRB на одной из хромосом [Murphy, Weaver, 2016]. Причем сначала происходит рекомбинация между сегментами D-J, а затем происходит присоединение варибельного сегмента V-DJ. Если рекомбинация прошла удачно, происходит синтез β -цепи TCR, соединение полученной полипептидной цепи с суррогатной α -цепью и выставление аналога зрелого TCR (pre-TCR) на поверхность клетки. Сигналинг через этот рецептор блокирует дальнейшие перестройки TRB локусов на обеих хромосомах и обеспечивает переход тимоцита к следующей стадии дифференцировки. Механизм аллельного исключения в случае перестроек локуса TRB неизвестен. Если полученная перестройка β -цепи непродуктивна, происходит второй раунд V(D)J-рекомбинации с использованием второго кластера сегментов D2-J2 (если они не были задействованы в первой перестройке) или локуса TRB на второй хромосоме. В клетках неспособных к образованию функционального pre-TCR происходит апоптоз.

Перед тем как происходит рекомбинация TRA локуса предшественники T-лимфоцитов проходят несколько делений. Следовательно, в зрелом T-клеточном репертуаре могут быть

клетки экспрессирующие TCR с одинаковой β -цепью и разной α -цепью, но не наоборот [Durić и др., 2019; Howie и др., 2015; Lee и др., 2017].

VJ-рекомбинация TRA локуса происходит на обеих хромосомах одновременно. Более того структура локуса позволяет в случае непродуктивной перестройки производить несколько последовательных перестроек на одной хромосоме с использованием все более дистально расположенных сегментов (Рисунок 2А). Из чего следует, что шанс на образование продуктивной α -цепи гораздо выше, чем для β -цепи TCR. Для того чтобы остановить перестройки α -цепи недостаточно только ее экспрессии – клетка должна пройти позитивную селекцию. Поскольку α -цепь, в отличие от β , не поддается аллельному исключению во многих Т-клетках имеются продуктивные перестройки двух α -цепей [Balakrishnan, Morris, 2016]. Однако большинство таких клеток скорее всего будут иметь лишь один функциональный рецептор, поскольку очень малое количество из образующихся рецепторов проходит положительную селекцию (см. главу 2.1.5). Возможная физиологическая роль клеток с двумя функциональными антигенными рецепторами активно обсуждается [Ahmed и др., 2019; Schuldt, Binstadt, 2019].

2.1.4. Механистическая модель сборки Т-клеточного рецептора

Сборка каждого отдельного CDR3 может быть описана как совокупность нескольких рекомбинационных событий и представлена в виде математической модели [Muguan и др., 2012]. Механистическая модель сборки α и β -цепей TCR позволяет оценить вероятность появления того или иного рецептора в репертуаре и имеет множество практических применений.

Рассмотрим принцип этой модели на примере β -цепи TCR. Для получения конкретной нуклеотидной последовательности CDR3 должен произойти набор событий (E), называемый рекомбинационным сценарием. Вероятность каждого рекомбинационного сценария (P_{recomb}) представляет собой произведение вероятностей конкретных событий рекомбинации (Формула 1): выбора TRBV, TRBD и TRBJ сегментов; количества делеций на 3'-конце V-гена ($\text{del}V$); количества делеций на 5'-конце J-гена ($\text{del}J$); количества делеций на обоих концах D-гена ($\text{del}5'D$, $\text{del}3'D$), специфической нуклеотидной последовательности инсерции ($x_1 \dots x_{\text{ins}VD}$) длины $\text{ins}VD$ в месте соединения сегментов V и D, а также специфической нуклеотидные последовательности инсерции ($x_1 \dots x_{\text{ins}DJ}$) длины $\text{ins}DJ$ в месте соединения сегментов D и J.

$$\begin{aligned}
P_{\text{recomb}}(E) &= P(V)P(D, J) \\
&\times P(\text{del}V|V)P(\text{del}J|J)P(\text{del}5'D, \text{del}3'D|D) \\
&\times P(\text{ins}VD) \prod_{i=1}^{\text{ins}VD} p_{VD}^{(2)}(x_i|x_{i-1})P(\text{ins}DJ) \prod_{i=1}^{\text{ins}DJ} p_{DJ}^{(2)}(y_i|y_{i-1}).
\end{aligned} \tag{1}$$

Репертуар антиген-распознающих рецепторов формируется не только в процессе V(D)J-рекомбинации, но и под влиянием позитивной и негативной селекции (см. главу 2.1.5). Для того чтобы вывести правильные параметры описанной математической модели необходимо исследовать нуклеотидные последовательности TCR без воздействия на них селекции. Для этого были использованы непродуктивные перестройки цепей TCR – последовательности CDR3 со сдвинутой рамкой считывания или преждевременным стоп-кодоном. Такие нуклеотидные последовательности появляются в следствии «неудачной» VDJ-рекомбинации на одной из двух хромосом Т-лимфоцита.

Полученная математическая модель усложняется тем, что каждая конкретная нуклеотидная последовательность CDR3 (σ) может быть получена большим количеством рекомбинационных сценариев. Для того чтобы оценить вероятность сборки каждого CDR3 (P_{gen}) необходимо сложить вероятности всех рекомбинационных сценариев, по которым может быть получена данная нуклеотидная последовательность CDR3 (Формула 2).

$$P_{\text{gen}}(\sigma) = \sum_{E \in E_{\sigma}} P_{\text{recomb}}(E). \tag{2}$$

Полученная модель позволяет оценить вероятность сборки любых CDR3, причем эта вероятность зависит исключительно от работы молекулярной системы рекомбинации, но не от факторов селекции. В первом приближении такая модель может быть использована для оценки вероятностей сборки TCR β у разных людей и для разных фракций Т-клеток (наивные клетки, клетки памяти и т.д) без необходимости дополнительного обучения модели.

Подсчет вероятностей сборки цепей TCR имеет широкое практическое применение в современных исследованиях TCR репертуаров методами высокопроизводительного секвенирования. Применение этой математической модели помогает оценить вероятность того, что каждый конкретный CDR3 будет общим у нескольких индивидов, то есть понять мог ли такой рецептор сформироваться несколько раз независимо [Elhanati и др., 2018]. Эта информация может быть использована для выявления контаминации в данных секвенирования [Pogorelyu и др., 2018a], поиска удачных маркеров для мониторинга минимальной остаточной болезни [Nazarov и др., 2016], выявления аутоиммунных клонов у людей с определенными заболеваниями [Pogorelyu и др., 2018a]. Одна из работ нашей лаборатории была связана с

исследованием Т-клеточного репертуара идентичных близнецов [Pogorelyu и др., 2017]. Оказалось, что близнецы имеют не только высоковероятные общие клоны (как неродственные доноры), но и достаточно большое количество (20 на 1000) общих клонов с низкой вероятностью сборки. Наличие в Т-клеточных репертуарах таких клонов не может быть объяснено независимой сборкой в двух индивидах. Полученные данные свидетельствуют о том, что близнецы могут обмениваться отдельными Т-клонами во время внутриутробного развития и эти клоны могут оставаться в организме человека более 20 лет. Вопрос о том связывают ли такие клоны какой-то антиген остается открытым.

В настоящее время разработаны также математическая модель для сборки α -цепей TCR [Elhanati и др., 2016], сборки В-клеточного рецептора [Elhanati и др., 2015], а также программное обеспечение для подсчета вероятностей сборки как на уровне нуклеотидов [Marcou, Mora, Walczak, 2017], так и на уровне аминокислот [Sethna и др., 2019].

2.1.5. Позитивная и негативная селекция Т-лимфоцитов

Процесс V(D)J рекомбинации – это лишь первый этап формирования наблюдаемого репертуара Т-клеточных рецепторов. На этом этапе образуется все разнообразие TCR рецепторов, которое затем будет существенно снижено при селекции в тимусе и селекции на периферии. Поскольку процесс рекомбинации происходит абсолютно случайно, в ее ходе могут сформироваться: а) рецепторы, узнающие антигены собственного организма и способные вызвать аутоиммунную реакцию; б) рецепторы, которые не способны к распознаванию антигенов в контексте имеющихся аллелей МНС в принципе. Существование в организме рецепторов первого типа опасно, а второго не имеет смысла, именно эти проблемы решает процесс функциональной селекции Т-клеток [Murphy, Weaver, 2016].

Как и В-клетки предшественники Т-лимфоцитов образуются в костном мозге, однако дальнейшее их созревание происходит в тимусе. Эпителиальные клетки коркового вещества тимуса имеют множество отростков и создают специальное микроокружение для созревания Т-клеток. Главная задача клеток коркового вещества тимуса – презентация собственных антигенов CD4+CD8+ предшественникам лимфоцитов, поэтому эти клетки в большом количестве экспрессируют МНС как I, так и II класса на своей поверхности. Для того чтобы пройти селекцию CD4+CD8+ Т-лимфоциты должны соответствовать двум условиям [Murphy, Weaver, 2016]: а) должны быть способны распознать рМНС комплекс (позитивная селекция); б) не связывать рМНС слишком сильно (негативная селекция).

В процессе положительной селекции отфильтровываются лимфоциты, которые в принципе не способны связывать собственные МНС, а значит не смогут впоследствии узнавать

чужеродные антигены, представленные на поверхности клеток. В CD4+CD8+ Т-лимфоцитах не способных узнавать антигены в контексте какого-либо МНС происходит апоптоз. Только 10-30% всех предшественников Т-клеток проходит положительную селекцию [Klein и др., 2009]. После прохождения позитивной селекции на поверхности Т-лимфоцитов остается только один тип корецепторных молекул в зависимости от того аллели I или II класса рецептор связывает сильнее [Takada, Takahama, 2015]. Таким образом, на этой стадии также происходит определение фенотипа будущих Т-клеток: CD8+ (цитотоксические клетки) или CD4+ (клетки-хелперы). МНС аллели в значительной степени формируют Т-клеточный репертуар. Показано, что люди с одинаковыми HLA аллелями имеют больше похожих TCR [Putintseva и др., 2013]. Более того существует классификатор, позволяющий определить наличие у человека определенных аллелей HLA по аминокислотным последовательностям, встречающимся в его TCR репертуаре [DeWitt и др., 2018].

Сильное связывание предшественников Т-лимфоцитов с комплексами собственных пептид-МНС приводит к гибели этих клеток путем апоптоза: процесс, называемый негативной селекцией. Поскольку главная цель отрицательной селекции – удаление из Т-клеточного репертуара максимального числа клеток реактивных на собственные белки, клетки тимуса должны иметь возможность презентировать как можно более широкий спектр пептидов организма. В эпителиальных клетках тимуса экспрессируется транскрипционный фактор AIRE (autoimmune regulator), обеспечивающий синтез многих тканеспецифических белков в этих клетках [Bansal и др., 2017]. Кроме того, недавно была показана значительная роль другого транскрипционного фактора FEZF2 в регуляции экспрессии тканеспецифических белков в тимусе [Takaba и др., 2015, с. 2]. Интересно, что гены, регулируемые этими двумя факторами, перекрываются лишь частично [Takaba, Takayanagi, 2017]. Негативная селекция может происходить как на стадии CD4+CD8+ тимоцитов, одновременно с положительной селекцией, так и на более поздних стадиях развития клеток. Часть Т-лимфоцитов сильно-связывающих собственные антигены в тимусе не погибает в результате негативной селекции, а становится Т-регуляторными клетками [Kraj, Ignatowicz, 2018]. Как именно происходит выбор между апоптозом и дифференцировкой в регуляторные клетки неясно.

Помимо селекции в тимусе огромное влияние на TCR репертуар оказывает взаимодействие с антигенами, то есть селекция на периферии. При взаимодействии с антигеном Т-клетка получает сигнал к дифференцировке и делению, а значит наблюдаемая численность ее TCR в репертуаре увеличится. Показано, что люди с хроническими вирусными инфекциями (вирус Эпштейна-Барр EBV и цитомегаловирус CMV) имеют большое количество экспандированных TCR в репертуаре, специфичных к этим антигенам [Emerson и др., 2017].

Интересно, что специфичности подавляющего большинства самых представленных TCR в репертуарах абсолютно неизвестны.

2.2. Изучение репертуаров Т-клеточных рецепторов с помощью высокопроизводительного секвенирования

Первые работы, посвященные изучению первичной структуры TCR, были основаны на методе спектра-типирования и последующем секвенировании методом Сэнгера [Six и др., 2013]. Такой подход может дать представления только о небольшом количестве высокопредставленных клонов. С развитием методов высокопроизводительного секвенирования стало возможным изучение не только рецепторов отдельных клонов, но и изучение разнообразия их нуклеотидных последовательностей и их представленности, то есть репертуара TCR.

В настоящее время есть несколько основных подходов для получения библиотек TCR. С одной стороны, можно использовать стандартные методы секвенирования всего транскриптома (RNAseq), в том числе единичных клеток. При использовании метода секвенирования тотальной мРНК клеток можно получить дополнительную информацию об экспрессии генов, но количество последовательностей TCR среди библиотеки будет очень мало. Принципиально другим подходом является получение библиотек, обогащенных последовательностями переменных участков антиген-распознающих рецепторов. Существует множество стратегий получения библиотек антиген-распознающих рецепторов [Boyd, Crowe, 2016; Friedensohn, Khan, Reddy, 2017; Rosati и др., 2017], которые можно разделить на две большие группы: использующие в качестве стартового материала ДНК [Kitaura и др., 2016; Lin и др., 2016; Robins и др., 2009] или использующие РНК [Cole и др., 2016; Freeman и др., 2009; Mamedov и др., 2013; Pogorelyu и др., 2017; Quigley и др., 2011; Turchaninova и др., 2016] (Рисунок 3).

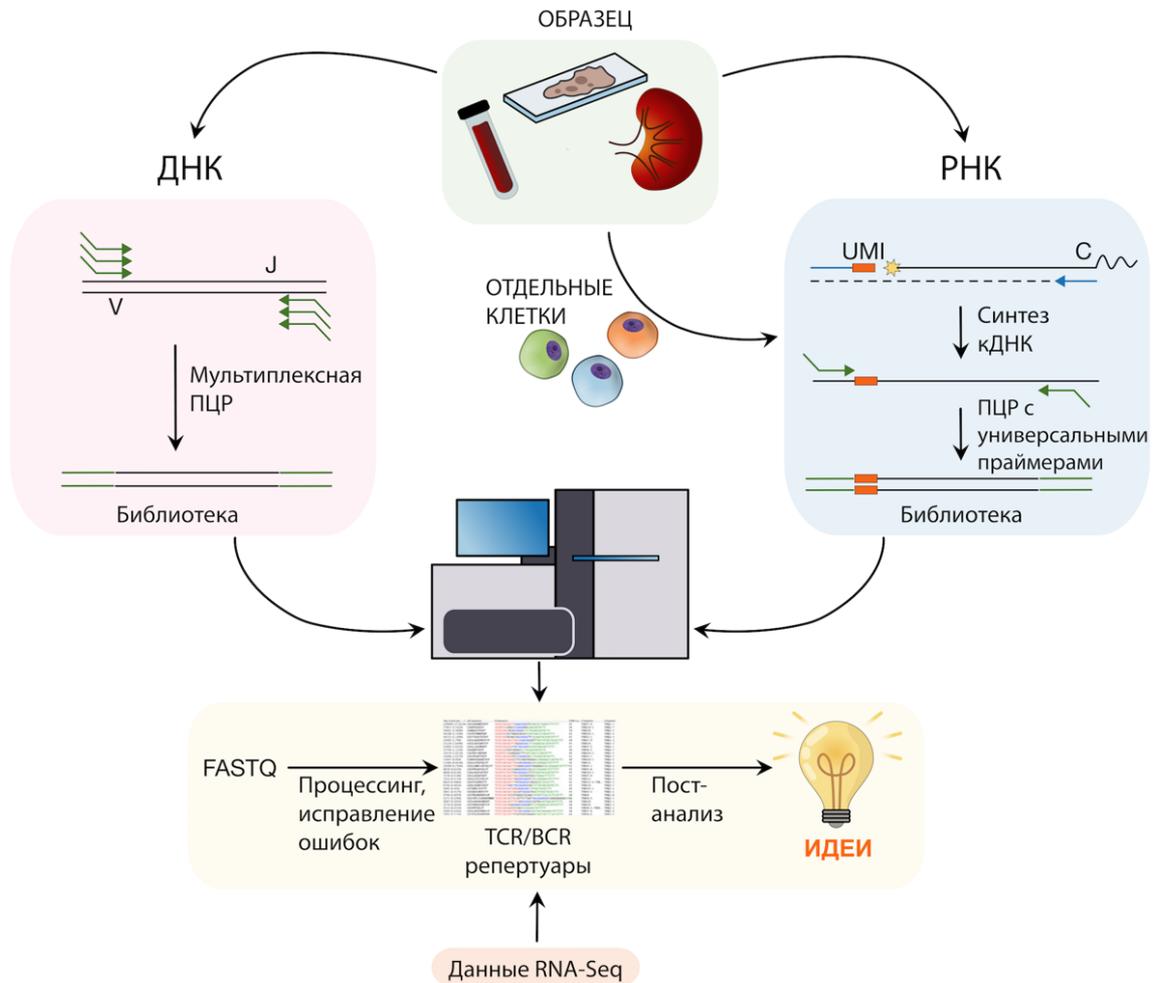


Рис. 3. Схема методов получения библиотек TCR. В качестве стартового материала для получения библиотек может быть использована ДНК или РНК интересующего образца. При использовании РНК на этапе синтеза кДНК может быть введен UMI – уникальный молекулярный идентификатор образца. Репертуары TCR также могут быть получены из тотального RNAseq с использованием специализированных алгоритмов.

Методы, основанные на РНК используют принцип смены матрицы обратной транскриптазой при 5'RACE [Matz и др., 1999] или лигирование одноцепочечных РНК [Best и др., 2015; Oakes и др., 2017] для введения универсального олигонуклеотида для ПЦР. Использование обратной транскрипции также позволяет ввести в каждую молекулу уникальный молекулярный идентификатор (UMI – unique molecular identifier), с помощью которого возможно скорректировать ошибки секвенирования и обеспечить более точный подсчет количества каждого TCR [Kivioja и др., 2011]. Однако, такой подход не учитывает различий в экспрессии РНК в различных клетках, что особенно существенно при исследовании репертуаров BCR.

Основной проблемой методов, основанных на ДНК, является необходимость использования множества праймеров, комплементарных всем V и J сегментам, для амплификации последовательности рецептора. Такая сложная ПЦР приводит к значительным сдвигам в представленности отдельных последовательностей, что может привести к потере редких вариантов TCR. Альтернативой мультиплексной ПЦР и 5'RACE является использование систем с гибридизацией [Linnemann и др., 2013; Ruggiero и др., 2015].

Наиболее современные группы методов позволяют получать парные репертуары α -и β -цепей TCR для отдельных клеток [De Simone, Rossetti, Pagani, 2018; Friedensohn, Khan, Reddy, 2017; Nan и др., 2014; Turchaninova и др., 2016]. В настоящее время системы на основе эмульсий позволяют получать парные TCR для 10000 клеток в одной реакции, с выходом не менее 50% [De Simone, Rossetti, Pagani, 2018]. Такие эмульсионные системы позволяют получать одновременно библиотеки TCR и тотальной РНК отдельных клеток. Клетки предварительно можно пометить антителами или рМНС-мультимером, несущими нуклеотидный баркод, и дополнительно получить информацию о фенотипе или специфичности клетки.

Для обработки данных секвенирования библиотек TCR и BCR разработано большое количество специализированных программ [Bolotin и др., 2015; Duez и др., 2016; Kuchenbecker и др., 2015; Li и др., 2017; Miho и др., 2018]. Главной особенностью таких данных является то, что в геноме отсутствуют референсные последовательности переменных участков рецепторов, и нужны алгоритмы для правильной сборки таких последовательностей. Результатом работы таких алгоритмов, являются таблицы TCR с выделенными нуклеотидными последовательностями CDR3, численностями, а также аллелями V и J сегментов, использованных при рекомбинации. Строки таких таблиц также принято называть клонотипами (чаще используется при секвенировании одной цепи рецептора) или клонами. Некоторые из этих программ позволяют выделять клонотипы TCR и BCR из данных секвенирования тотальной РНК как смеси, так и отдельных клеток. Если при приготовлении библиотек использовались UMI возможно использование дополнительных программ [Shugay и др., 2014], позволяющих скорректировать ошибки секвенирования и ПЦР, путем составления консенсусных последовательностей клонотипов, несущих определенный UMI. Было разработано большое количество программ для последующего анализа иммунных репертуаров [Nazarov и др., 2015; Schaller и др., 2015; Shugay и др., 2015], включая биоинформатические алгоритмы для предсказания специфичности новых TCR на основе их аминокислотной последовательности [Dash и др., 2017; De Neuter и др., 2018; Gielis и др., 2019; Glanville и др., 2017] с использованием баз данных TCR с известной специфичностью [Bagaev и др., 2019; Shugay и др., 2018; Tickotsky и др., 2017].

Таким образом, результатом любого эксперимента по секвенированию репертуаров иммунных рецепторов, являются таблицы, содержащие информацию о количестве каждого клонотипа, нуклеотидной и аминокислотной последовательности его рецептора (обычно одной цепи). Принципиально можно выделить несколько подходов к использованию такой информации (Рисунок 4): 1) изучение распределения представленности клонов в репертуаре, то есть его разнообразия и клональности; 2) использование нуклеотидной последовательности CDR3 клонов, для того, чтобы следить за ними во времени (например, до и после иммунизации); 3) или пространстве (например, между кровью и тканью, или между различными популяциями клеток); 4) использование аминокислотных последовательностей рецепторов для поиска пересечений в группе доноров (например, имеющих одинаковое аутоиммунное заболевание); 5) исследование особенностей самих последовательностей рецепторов (например длина CDR3, использование V и J-сегментов, поиск мотивов).

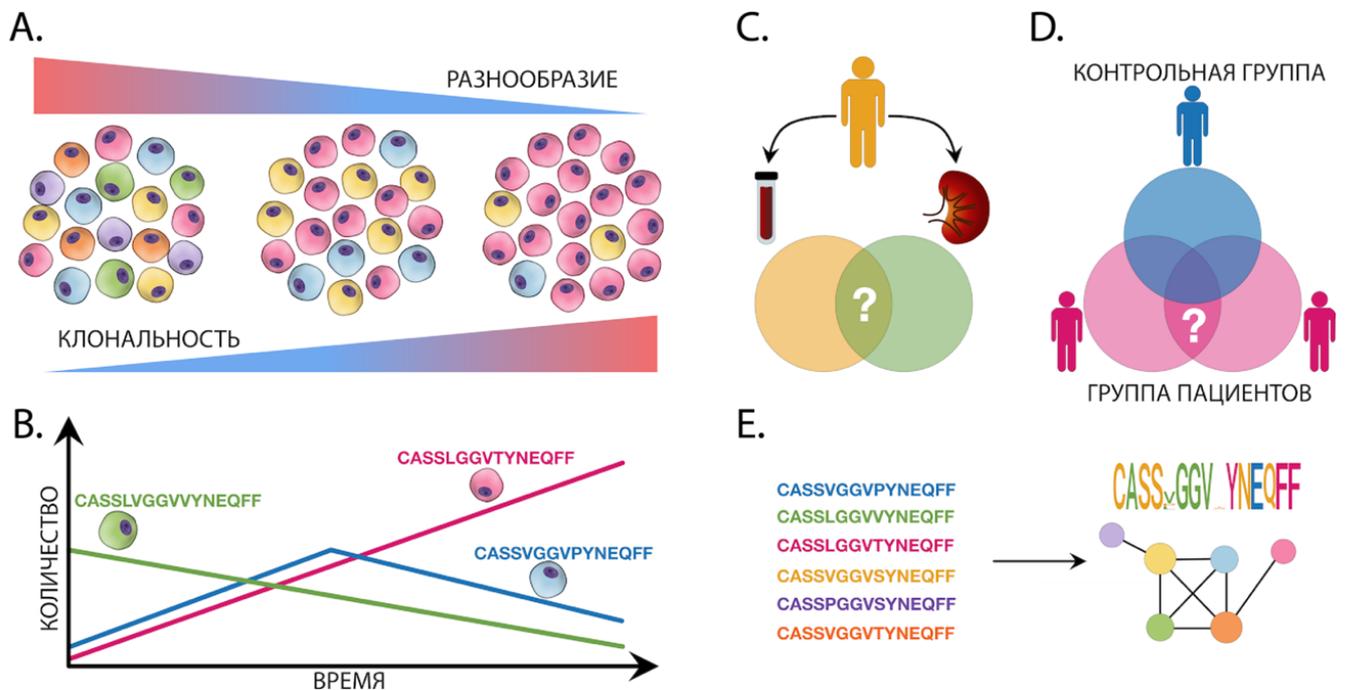


Рис. 4. Принципиальные подходы к исследованию репертуаров TCR. **A.** Изучение статистик распределения частот клонотипов в репертуаре; **B.** Слежение за клонами во времени и **C.** Пространстве; **D.** Поиск похожих TCR у группы доноров; **E.** Изучение свойств аминокислотных последовательностей TCR.

2.2.1. Статистики распределения частот клонотипов

Потенциальное разнообразие TCR β составляет около 10^{14} [Murugan и др., 2012], что значительно превосходит разнообразие, реализуемое в организме человека. Считается что количество уникальных TCR β внутри человеческого организма составляет 10^8 , что все еще

гораздо больше, чем количество вариантов, которое можно получить даже при очень глубоком секвенировании. Было разработано много выборочных статистик, позволяющих оценивать разнообразие TCR репертуаров, исходя из распределения частот клонотипов в отсеквенированном образце [Chaara и др., 2018; Kaplinsky, Arnaout, 2016; Laydon и др., 2014; Lee, Chao, 1994]. Наиболее распространенным является использование энтропии Шеннона и ее модификаций [Chaara и др., 2018]. Значение этого индекса приближается к 1, если клонотипы распределены в репертуаре равномерно, примером такого распределения является репертуар наивных клеток человека. Когда организм взаимодействует с антигеном, происходит экспансия наивных клеток в репертуаре, что приводит к изменениям в распределении частот клонов. Для того, чтобы оценить такие изменения используют различные индексы клоальности (например, индекс Джини-Симпсона). Во многих случаях индексы клоальности обратны индексам разнообразия, так что в общем случае высокая клоальность репертуара означает его низкое разнообразие.

Выборочные статистики упрощают всю сложную структуру репертуаров антиген-распознающих рецепторов до одного значения. Это существенно упрощает сравнение разных репертуаров и часто коррелирует с биологическим эффектом. Так, высокая клоальность TCR репертуаров наблюдается у пациентов с различными аутоиммунными заболеваниями: в крови пациентов с системной красной волчанкой [Thara и др., 2015], в местах поражения кожи при псориазе [Matos и др., 2017], при болезни Крона [Allez и др., 2019]. Статистики TCR репертуаров пытаются использовать как маркеры эффективности иммунотерапии. Повышенная клоальность репертуаров Т-клеток опухолей была обнаружена у пациентов, отвечающих на терапию анти-PD1 антителом, но не для пациентов с анти-CTLA-4 терапией [Amagi и др., 2018; Forde и др., 2018; Roh и др., 2017]. С другой стороны, высокое разнообразие TCR репертуаров периферической крови после анти-CTLA-4 терапии было связано с развитием серьезных побочных эффектов у пациентов с раком простаты [Oh и др., 2017; Subudhi и др., 2016] и меланомой [Robert и др., 2014].

Несмотря на широкое применение, выборочные статистики имеют ряд недостатков. Так, они не дают представление о механизмах лежащих в основе различий между исследуемыми группами. Кроме того, все индексы клоальности и разнообразия зависят от отбора образца и глубины секвенирования, поэтому полученные клоальные частоты необходимо правильно нормировать. Побочные биологические факторы могут существенно влиять на статистики TCR репертуаров, так было показано, что разнообразие падает с возрастом [Britanova и др., 2016] и при наличии хронических инфекций CMV и EBV [Tu, Rao, 2016].

2.2.2. Изучение клональной динамики

Структура цепей TCR настолько разнообразна, что в большинстве случаев нуклеотидную последовательность TCR можно использовать как уникальный идентификатор клона. Сравнивая численность отдельных клонотипов до и после встречи с каким-либо антигенным стимулом (вакцинация, инфекция, лечение и т.д), можно непосредственно наблюдать экспансию отвечающих клонов. Таким образом была показана экспансия множества клонов в ответ на вакцинацию против желтой лихорадки [DeWitt и др., 2015; Pogorelyu и др., 2018b], против ветряной оспы [Qi и др., 2016] и лишь небольшие изменения в концентрации отдельных клонов при иммунизации от гриппа [Sycheva и др., 2018]. Главным ограничением подобного подхода к поиску отвечающих на вакцинацию клонотипов является необходимость получения точки до стимуляции антигеном. Однако, нами было показано, что в случае сильных экспансий падение концентрации между пиком инфекции и точкой после может быть использовано для идентификации специфических клонов [Pogorelyu и др., 2018b].

Одним из типов современной терапии опухолей является адоптивный перенос Т-клеток. Высокопроизводительное секвенирование репертуаров TCR позволяет следить за такими клетками в организме человека уже после трансплантации Т-клеток. Так было показано, что при лечении меланомы можно наблюдать экспансию этих клонов на 7 день после трансплантации [Charuis и др., 2017]. Более того оказалось, что у пациентов, хорошо отвечающих на терапию, часто присутствовал доминирующий клонотип, который можно было детектировать в крови более 300 дней после трансплантации. Считается, что именно такие клоны важны для контроля над опухолью.

Мониторинг частот клонотипов во времени применяется при исследовании эффективности пересадок костного мозга. Секвенирование TCR в различных точках после пересадки позволяет отследить восстановление разнообразия репертуара [Zvyagin и др., 2017]. На ранних стадиях после пересадки репертуар активно занимается клонами донора, которые в течении двух лет заменяются наивными клетками из тимуса. Кроме того, было показано, что значительные экспансии Т-клонов донора могут быть неблагоприятным фактором и означать развитие реакции «трансплантат против хозяина» [Morris и др., 2015] или реактивацию хронической CMV инфекции [Link и др., 2016; Suessmuth и др., 2015].

2.2.3. Изучение распределения клонотипов в пространстве

Высокопроизводительное секвенирование репертуаров TCR позволяет определять клонотипы, которые значимо обогащены в какой-либо субпопуляции (например, CD4/CD8, клеток с активированным фенотипом или клеток, связывающих рМНС-мультимер) по

сравнению с периферической кровью. Соотнося нуклеотидные последовательности TCR из тотальной фракции мононуклеаров периферической крови (PBMC) и субпопуляции, полученной с помощью FACS, можно получить и информацию о представленности клона, и информацию о его фенотипе. Кроме того, можно сравнивать между собой репертуары периферической крови и других тканей.

Так было показано, что CD8+PD1+ клоны [Gros и др., 2016] и CD4+T-регуляторные клоны [Ahmadzadeh и др., 2019] периферической крови соответствуют клонам этого же фенотипа в опухолевом инфильтрате. Кроме того, недавно были описаны способы получения репертуаров TCR из лимфоцитов мочи, которые также соответствуют репертуарам лимфоцитов из инфильтрата опухолей у пациентов с раком мочевого пузыря [Wong и др., 2018]. Такие исследования могут помочь в разработке новых, менее инвазивных методов обнаружения TCR, специфичных к опухолевым неоантигенам. Было показано, что обнаружение одинаковых клонотипов TCR в разных тканях свойственно клеткам памяти, но не наивным клеткам [Thome и др., 2016]. Исследования по распределению клонотипов TCR по разным органам человека практически отсутствуют. Но было показано, наличие двух неперекрывающихся резервуаров для В-клеток в организме человека: одни клоны оказались распределены между кровью, лимфой, лимфатическими узлами и легкими, а другие внутри желудочно-кишечного тракта [Meng и др., 2017].

2.2.4. Поиск одинаковых клонотипов у группы доноров

Несмотря на то что нуклеотидные последовательности TCR могут быть использованы в качестве уникального идентификатора клона, конвергентная рекомбинация одинаковых аминокислотных последовательностей рецепторов не является невозможной. Клонотипы, которые присутствуют у нескольких доноров принято называть публичными, а клонотипы, которые встречаются у конкретного индивида приватными. Некоторые рецепторы генерируются в процессе V(D)J-рекомбинации гораздо чаще других, что описывается математическими моделями сборки рецепторов (см. главу 2.1.4). Для того чтобы встречаться во многих донорах, публичные TCR должны собираться часто в процессе V(D)J-рекомбинации, то есть иметь более высокую вероятность сборки. Таким образом, не существует четкого разделения на публичные и приватные клонотипы, а есть вероятность того, что клонотип будет публичным, и это определяется непосредственно клеточной машинерией рекомбинации. На публичность клонотипа также влияет процесс селекции в тимусе и особенно на периферии. При взаимодействии с антигеном происходит экспансия специфических Т-клеток, что увеличивает шансы детектировать TCR этих клонов при секвенировании репертуаров. Это означает, что

индивиды с определенным заболеванием могут иметь похожие TCR, которые не будут встречаться при секвенировании репертуаров здоровых доноров.

Прекрасным примером такого подхода является исследование TCR репертуаров когорты 666 доноров с известным CMV статусом [Emerson и др., 2017]. С помощью точного теста Фишера был выявлен набор клонотипов, которые встречаются у больных доноров чаще, чем в здоровых индивидах. Этот набор TCR затем был использован для определения CMV статуса в независимой когорте пациентов. Высокая точность работы полученного классификатора была подтверждена другой группой ученых [De Neuter и др., 2019]. Таким же методом, были обнаружены общие аминокислотные последовательности TCR при анкилозирующем спондилите [Faham и др., 2017]. В нашей лаборатории похожие TCR в группе больных спондилитом были обнаружены с помощью другого статистического подхода, основанного на применении вероятностей сборки цепей TCR [Pogorelyu и др., 2018a]. Кроме того, было показано, что Т-клетки с этим рецептором обогащены в синовиальной жидкости воспаленного сустава по сравнению с периферической кровью [Komech и др., 2018]. Общие клонотипы TCR были обнаружены и в когортах пациентов с другими аутоиммунными заболеваниями: псориаз [Matos и др., 2017], нарколепсия [Latorre и др., 2018], диабет 1 типа [Seay и др., 2016].

Исследования TCR репертуаров когорт пациентов с определенным заболеванием могут помочь выявить реактивные Т-клетки, даже если антиген неизвестен. Для правильного выявления таких клонов необходимо использовать дополнительно когорты здоровых доноров или вычисление вероятностей сборки рецептора, чтобы определить, что их присутствие в таком количестве больных доноров неслучайно.

2.2.5. Изучение особенностей первичной структуры TCR

Теоретически специфичность каждого Т-клеточного рецептора записана в его аминокислотной последовательности. Однако до сих пор не существует алгоритма, позволяющего предсказать, что распознает конкретный рецептор, основываясь на этой последовательности. Тем не менее можно определить особенности структуры TCR, важные для распознавания антигена. Известно, что Т-клетки, связывающие одинаковый эпитоп, часто имеют схожую аминокислотную последовательность TCR [Dash и др., 2017; Gielis и др., 2019; Glanville и др., 2017].

Недавно было предложено два алгоритма, позволяющих выделить из данных секвенирования группы TCR, распознающие одинаковые пептиды: GLIPH [Glanville и др., 2017] и TCRdist [Dash и др., 2017]. Такие группы схожих TCR выделяются на основе использования V-сегментов, длины CDR3 и наличия коротких мотивов в CDR3. Предложенные

алгоритмы хорошо выделяют группы TCR с одинаковой известной специфичностью среди смеси TCR, распознающих небольшое количество пептидов. Эффективность работы подобных алгоритмов может существенно возрасти с увеличением количества аминокислотных последовательностей в базах данных TCR, специфичных к различным эпитопам [Bagaev и др., 2019]. Уже сейчас с помощью TCRdist удалось определить, что многие TCR из репертуаров доноров из работы [Emerson и др., 2017], специфичны к таким патогенам, как CMV, EBV и вирусу гриппа [DeWitt и др., 2018].

2.3. Вирус желтой лихорадки

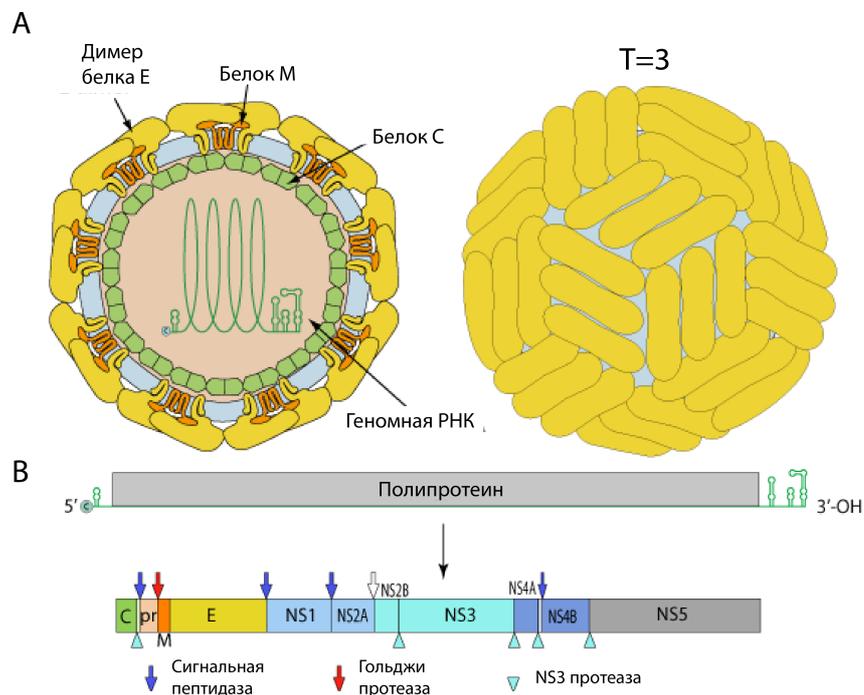


Рис. 5. Структура вируса желтой лихорадки (цит. по viralzone.expasy.org). **А.** Вирус желтой лихорадки имеет небольшой икосаэдрический капсид. **В.** Геномная РНК вируса кодирует единый полипротеин, который затем разрезается клеточными и вирусными протеазами.

Вирус желтой лихорадки относится к семейству *Flaviviridae* и представляет собой небольшой РНК-содержащий вирус [Freed, Martin, 2013]. YFV имеет икосаэдрический капсид диаметром около 50 нм, покрытый липидной оболочкой (Рисунок 5А). Геном вируса ЖЛ – это +РНК длиной около 10 кб. Как и для других +РНК вирусов, РНК вируса ЖЛ является инфекционной.

Геном вируса ЖЛ содержит одну открытую рамку считывания, трансляция которой приводит к образованию единого полипротеина (Рисунок 5В). Полученный полипротеин ко- и пост-трансляционно разрезается с образованием 10 белков: трех структурных (С, М и Е) и 7

неструктурных (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) [Chambers, Grakoui, Rice, 1991]. Разрезание полипротеина происходит как с помощью вирусных протеаз, так и при помощи клеточных белков. Белок С – основной структурный белок вируса желтой лихорадки из которого построен капсид вируса. Гетеродимеры из мембранного белка М и поверхностного гликопротеина Е модифицируют липидную оболочку вируса. Эти белки играют важную роль в инфекции, обеспечивая связывание рецептора и слияние мембран при проникновении вируса в клетку. Гены неструктурных белков вируса ЖЛ кодируют вирусную РНК-полимеразу (NS5), хеликазу и протеазу(NS3), а также ряд белков, участвующих в репликации (NS1, NS4B), блокировании иммунного ответа (NS2A, NS4B) и созревании вириона [Freed, Martin, 2013]. Функции многих неструктурных белков не до конца изучены.

Вирус ЖЛ – это арбовирус, основным переносчиком которого являются комары *Aedes aegypti*. Попадая в кровь человека вирус быстро размножается в клетках печени, почек, макрофагах, моноцитах и дендритных клетках, что приводит к развитию симптомов, характерных для геморрагических лихорадок [Watson, Klimstra, 2017]. Тяжелая инфекция развивается у примерно 15% зараженных индивидов, из которых в половине случаев приводит к летальному исходу.

Желтая лихорадка оставалась одной из самых страшных тропических болезней, пока в середине прошлого века произошел настоящий прорыв в медицине – была разработана вакцина от желтой лихорадки. В настоящее время желтая лихорадка распространена в Центральной Африке и Южной Америке, где имеет природный резервуар, из-за чего вирус плохо поддается контролю [Watson, Klimstra, 2017].

2.3.1. Вакцина от вируса желтой лихорадки

Вакцина от ЖЛ представляет собой живой аттенуированный вирус. В 1928 году инфекционный агент был выделен из крови пациента по имени Асиби и получил название Асиби штамма [Pulendran, 2009]. В 1930х годах Макс Тейлеру удалось получить аттенуированный вирус путем многократных пассажей этого штамма в куриных эмбрионах. Полученный живой аттенуированный вирус YFV17D не вызывал развития болезни, но был иммуногенен. Уже в 1937 году полученная вакцина широко использовалась, причем вакцина оказалась настолько эффективной, что в 1951 году Тейлер получил Нобелевскую премию “За открытия, связанные с желтой лихорадкой, и борьбу с ней” [Norrgby, 2007].

Вакцинный штамм вируса ЖЛ играет важную роль в развитии современной иммунологии. YFV17D широко используется в качестве вектора при разработке новых вакцин, особенно против других представителей семейства *Flaviviridae*: вируса денге, вируса лихорадки

Западного Нила и японского энцефалита [Monath и др., 2015; Most van Der и др., 2000]. Кроме того, поскольку вирусный штамм наряду с диким типом вируса вызывает виремию в организме человека, вакцинация от ЖЛ представляет собой хорошую модель острой вирусной инфекции для изучения иммунного ответа. Отдельный интерес представляет собой исследования формирования иммунной памяти при вакцинации YFV17D, обеспечивающей длительный иммунитет против вируса ЖЛ.

2.4. Адаптивный иммунный ответ на первичную вакцинацию от вируса желтой лихорадки

Долгое время считалось, что основная роль в защите от вируса желтой лихорадки принадлежит нейтрализующим антителам [Watson, Klimstra, 2017]. Концентрация ранних исследований противовирусной вакцинации на гуморальном иммунном ответе во многом связана с недостаточным развитием методических подходов к изучению клеточного иммунного ответа. Только в 2008 году с развитием проточной цитофлуориметрии появилась первая серьезная работа по изучению Т-клеточного ответа на первичную вакцинацию от желтой лихорадки [Miller и др., 2008].

2.4.1 Динамика клеточного ответа на вирус желтой лихорадки

Большинство систематических работ по изучению иммунного ответа на вакцинацию от желтой лихорадки имеет схожий дизайн эксперимента. Исследования предполагают сравнение индивидуальных параметров доноров до вакцинации и в различных точках после введения YFV17D. Такая структура эксперимента значительно лучше, чем простое сравнение когорт, вакцинированных и невакцинированных доноров, поскольку иммунный ответ гетерогенен и может существенно варьировать у разных людей.

Было получено много данных о динамике клеточного иммунного ответа на вакцинацию от желтой лихорадки (Рисунок 6). Вирусная РНК обнаруживается в плазме доноров на 2-3 день после введения вакцины и достигает своего пика на день 7 [Akondy и др., 2015; Miller и др., 2008]. К этому моменту на детектируемом уровне появляются активированные CD8 клетки [Kongsgaard и др., 2017; Miller и др., 2008]. Было показано, что в ответ на вакцинацию от ЖЛ CD8 Т-клетки приобретают следующие активационные маркеры: CD38+HLA-DR+Ki-67+Bcl2^{low}. Причем эти маркеры коэкспрессируются в одних клетках и возможно использование только двух маркеров (CD38 в сочетании с HLA-DR или Ki-67 в сочетании с Bcl2) для определения активированной популяции цитотоксических Т-лимфоцитов [Miller и др., 2008].

др., 2008]. Активированные клетки достигают пика через 2 недели после вакцинации, где могут составлять до 20% всех CD8 Т-клеток [Kongsgaard и др., 2017; Miller и др., 2008; Wieten и др., 2016].

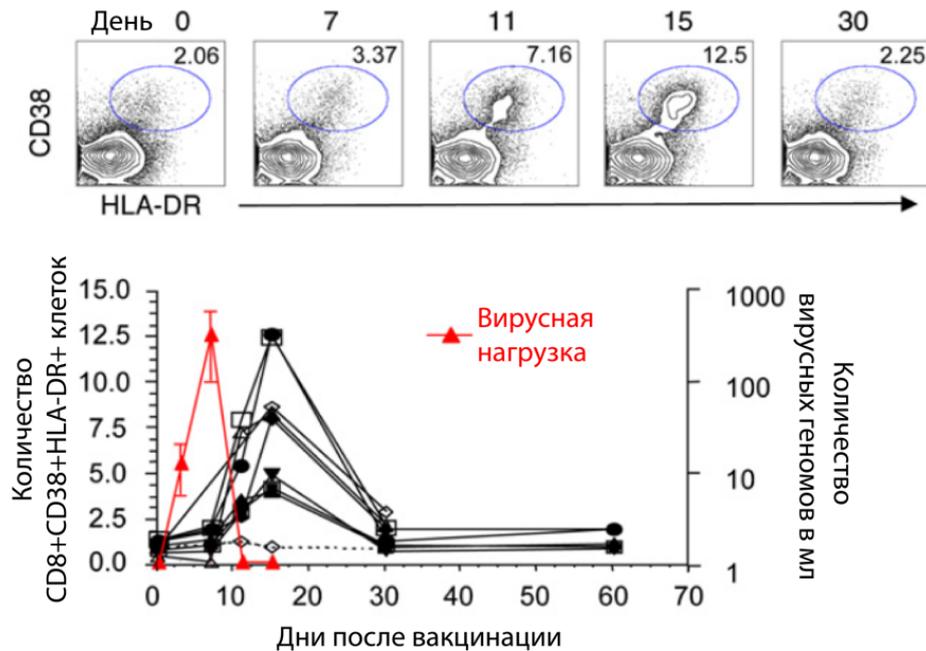


Рис. 6. Динамика ответа CD8 клеток на первичную вакцинацию от желтой лихорадки (цит. по. [Miller и др., 2008]). На графике изображено относительное количество активированных CD8 клеток в крови разных доноров в различных точках после вакцинации. Красная линия показывает уровень вирусной нагрузки (вирусных геномов на мл). На верхней части рисунка показаны результаты цитофлуориметрии с двумя маркерами активации CD38 и HLA-DR на разные дни после вакцинации. Синим обведена популяция активированных клеток и указан процент, который она составляет от всех CD8 клеток.

Динамика ответа CD4 клеток на первичную вакцинацию от ЖЛ похожа на динамику ответа CD8 клеток. Некоторые исследования показали, что пик CD4 ответа наступает несколько раньше (день 10), чем пик CD8 [Blom и др., 2013; Kohler и др., 2012], но в других работах такой особенности не наблюдается [Kongsgaard и др., 2017]. CD4 клетки в основном выделяют цитокины, характерные для Th1 фенотипа [James и др., 2013], то есть обеспечивают активацию клеточного иммунного ответа. В целом ответ CD4 Т-клеток изучен хуже, чем CD8 Т-клеток.

На пике ответа в среднем 6% CD8 клеток имеет активированный фенотип и это значение может достигать 20% у некоторых доноров [Kongsgaard и др., 2017; Miller и др., 2008]. Для CD4 клеток это значение ниже, и составляет 3–4%. Сила ответа на противовирусную вакцинацию от желтой лихорадки существенно варьирует у разных доноров. Это может быть связано с

различными факторами: иммунным статусом индивида, HLA-генотипом человека, титром вируса в плазме.

Роль вирусной нагрузки в силе ответа CD8 клеток на вакцинацию YFV17D была изучена на большой когорте доноров [Akondy и др., 2015]. Несмотря на одинаковую динамику, количество активированных CD8 клеток на пике ответа может различаться у вакцинированных людей более чем в 100 раз. Оказалось, что сила ответа коррелирует со значением вирусной нагрузки на пике виремии. До достижения порогового значения вирусной нагрузки (более 250 геномов на мл) сила ответа растет вместе с ней. Причем при изменении концентрации вирусных геномов в плазме от 10 до 100 на мл количество активированных CD8 клеток возрастает более чем в 3 раза. Причины, приводящие к большим различиям в вирусной нагрузке при введении одинаковой вакцины YFV17D, остаются неизученными.

Сильный клеточный иммунный ответ приводит к полной элиминации вируса к дню 15. После чего количество активированных клеток начинает резко снижаться и достигает базового уровня ко дню 30 [Kongsgaard и др., 2017; Miller и др., 2008]. Несмотря на то, что активированные Т-клетки CD38+HLA-DR+Ki-67+Bcl2^{low} нельзя обнаружить уже через месяц после введения вакцины, специфичные к вирусу желтой лихорадки клетки можно обнаружить спустя годы [Akondy и др., 2009; James и др., 2013; Kongsgaard и др., 2017] и даже десятки лет после первичной вакцинации [Fuertes Marraco и др., 2015; Wieten и др., 2016].

Один из самых спорных вопросов – это наличие неспецифической активации Т-клеток в ответ на противовирусную вакцинацию. Для изучения этого вопроса на 14 день после вакцинации от вируса желтой лихорадки были исследованы фенотипы CD8 Т-клонов, имеющих известную специфичность [Miller и др., 2008]. Оказалось, что Т-клетки, специфичные к пептидам CMV, EBV, и гриппа не имеют маркеров активированного фенотипа (CD38+HLA-DR+Ki-67+Bcl2^{low}) на пике ответа против вируса ЖЛ. Эти данные свидетельствуют в пользу отсутствия или незначительного уровня явления неспецифической активации Т-клеток при вакцинации от ЖЛ.

2.4.2. Состав клеточного иммунного ответа на вирус желтой лихорадки

Клеточный ответ на вирус ЖЛ чрезвычайно разнообразен. С помощью стимуляции клеток библиотекой пептидов было выяснено, что как среди CD8, так и среди CD4 лимфоцитов каждого донора, есть клетки, отвечающие на пептиды в составе всех 10 белков вируса желтой лихорадки [Akondy и др., 2009; Blom и др., 2013; Co, Kilpatrick, Rothman, 2009; James и др., 2013; Melo de и др., 2013]. Интересно, что некоторые пептиды могут быть презентированы различными аллелями HLA [Melo de и др., 2013], в то время как другие имеют строгую

рестриктию. В составе вируса желтой лихорадки был обнаружен ряд иммунодоминантных пептидов в составе белков вируса ЖЛ, вызывающих активацию большого числа клеток у доноров с определенными HLA генотипами: NS4B (HLA-A02), NS5 (HLA-B07), NS1 (HLA-A24), NS2B (HLA-B35). Особенно среди них выделяется пептид LLWNGPMAV (позиции 214–222 а.о.) из белка NS4B, который презентруется на HLA-A02 [Akondy и др., 2009]. Пептид очень хорошо подходит для исследования специфических к вирусу ЖЛ Т-лимфоцитов по нескольким причинам. Во-первых, LLWNGPMAV вызывает очень сильный γ -интерфероновый ответ в условиях *in vitro* стимуляции. Во-вторых, пептид является супердоминантным, вызывая сильный ответ у всех доноров с HLA-A02. Более того HLA-A02, является самым распространенным аллелем в человеческой популяции и встречается примерно у 50% европейских доноров [Robinson и др., 2013].

В 2009 году группой Рафи Ахмеда был сделан первый МНС-тетрамер для вируса желтой лихорадки на основе пептида LLWNGPMAV: A2-NS4B₂₁₄₋₂₂₂ [Akondy и др., 2009]. МНС-тетрамер представляет собой четыре соединенных при помощи стрептавидина комплекса рМНС [Altman и др., 1996]. Необходимость создания мультимера МНС объясняется высокой скоростью диссоциации мономера рМНС от TCR, что не позволяет использовать его в качестве маркера. При взаимодействии МНС-тетрамера с TCR возникает сразу несколько контактов TCR-рМНС, что существенно повышает сродство. МНС-тетрамер может быть модифицирован любым пептидом и помечен флуорофором для использования в качестве маркера для проточной цитофлуорометрии. Технология окрашивания МНС-мультимерами сильно продвинулась: в настоящее время существуют комплексы из 10 молекул рМНС – рМНС декстримеры, обеспечивающие большую чувствительность, а также МНС-мультимеры на основе МНС II класса [Davis, Altman, Newell, 2011]. Окрашивание МНС-мультимером позволяет легко детектировать и количественно оценивать популяции антиген-специфических Т-клеток.

NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфические клетки обнаруживаются у некоторых доноров уже на 11 день после первичной вакцинации от вируса ЖЛ [Akondy и др., 2009]. На 15 день количество NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфических клеток может составлять до 17% от всех CD8 и почти все из них имеют активированный фенотип [Akondy и др., 2009; Kongsgaard и др., 2017]. Динамика антиген-специфических клеток отличается от динамики активированных CD8. Согласно исследованиям максимальное количество мультимер-специфических клеток наблюдается после пика активации, на 20 [Kongsgaard и др., 2017] или 30 день после вакцинации [Akondy и др., 2009]. Относительное количество антиген-специфических клеток резко падает после 30 дня и уже через несколько месяцев после вакцинации составляет у большинства доноров составляет менее 0.1% от всех CD8 клеток [Fuertes Marraco и др., 2015]. Для CD4 клеток не было

обнаружено иммунодоминантного пептида, хотя и удалось получить ряд МНС-мультимеров. Было показано, что динамика мультимер-специфических CD4 клеток такая же как и у CD8 клеток [James и др., 2013].

2.4.3. Образование Т-клеток памяти после вакцинации от желтой лихорадки

Вакцинация YFV17D приводит к формированию длительного иммунитета против вируса дикого типа, поэтому изучение клеточной памяти в этой модели представляет особый интерес. После активации Т-клеток в ответ на вакцинацию происходит переход части из них в клеточную память [Ahmed, Akondy, 2011]. Есть данные, что около 7% активированных вследствие вакцинации клеток становятся клетками-памяти [DeWitt и др., 2015]. Принято выделять несколько видов клеточной памяти, образование которых можно отследить по специфическим поверхностным маркерам: центральная память CM (CCR7+CD45RA-), эффекторная память EM (CCR7-CD45RA-), поздняя эффекторная память EMRA (CCR7-CD45RA+), «наивная» память Tscm (CCR7+CD45RA+CD95+CD58+).

Использование окрашивания МНС-мультимером вместе с окрашиванием на специфические маркеры памяти позволяет отследить судьбу антиген-специфических клеток через месяцы и годы после первичной активации. Удивительно, что NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфические клетки на уровне более 0.01% от CD8 могут быть обнаружены в крови некоторых доноров даже через 25 лет после вакцинации YFV17D [Fuertes Marraco и др., 2015]. У большинства доноров антиген-специфические клетки обнаруживаются во всех фракциях памяти, однако большая часть клеток памяти имеет фенотип поздних эффекторов EMRA [Co, Kilpatrick, Rothman, 2009; Fuertes Marraco и др., 2015; Wrammert и др., 2009]. Ранее считалось что реэкспрессия маркера CD45RA на поверхности клеток памяти говорит о терминальной стадии дифференцировки. Однако, в случае желтой лихорадки эти клетки показывают высокую способность к делению при стимуляции в условиях *in vitro* [Akondy и др., 2009; Fuertes Marraco и др., 2015].

Количество NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфических клеток существенно падает со временем для фракций CM, EM и EMRA [Fuertes Marraco и др., 2015]. Однако NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфические клетки Tscm памяти обнаруживаются на стабильном уровне около 0.02% от CD8 более 20 лет. Tscm – это недавно описанная фракция памяти, характеризующаяся наличием консервативных маркеров наивных клеток CD45RA+CCR7+, но также экспрессирующая ряд маркеров, нехарактерных для наивных клеток: CD95, CD58, CXCR3 [Afik и др., 2017; Fuertes Marraco и др., 2015]. Эти клетки с одной стороны имеют профиль транскрипции схожий с наивными клетками [Afik и др., 2017; Akondy и др., 2017], но в то же время паттерн метилирования генома

схожий с эффекторами [Akondy и др., 2017]. Так, например, ген перфорина, хоть и не транскрибируется в Tscm остается в деметилированном состоянии. Предполагается, что, сохраняя «следы» эффекторного фенотипа на эпигенетическом уровне, клеткам обеспечивается возможность к быстрой активации при встрече с антигеном. Вероятно, именно этот тип памяти может отвечать за длительный иммунитет против вируса ЖЛ.

С использованием мечения дейтерием удалось доказать, что долгоживущие клетки памяти к вирусу ЖЛ формируются непосредственно из эффекторных клеток [Akondy и др., 2017]. Добровольцы пили меченную дейтерием воду на 0–14 день после вакцинации от желтой лихорадки. В этот период ДНК всех активно размножавшихся клеток организма (в том числе T-клеток) стала содержать дейтерий. Масс-спектрометрия ДНК мультимер-специфичных T-клеток через несколько лет показала, что они содержат дейтерий, а значит образовались в период активного ответа на вакцинацию. Кроме того, на основании времени полураспада изотопа дейтерия удалось посчитать как часто делятся клетки памяти. Оказалось, что среднее время между делениями составляет 485 дней, в то время как для обычных T-клеток 30 дней.

2.4.4. Использование методов высокопроизводительного секвенирования для изучения T-клеточного ответа на вирус желтой лихорадки

Технологии высокопроизводительного секвенирования позволяют исследовать иммунный ответ на уровне отдельных клонов клеток. Первый глубокий анализ иммунного ответа на вакцинацию от желтой лихорадки был проведен для CD8 лимфоцитов [DeWitt и др., 2015]. Работа представляет собой совмещение динамических исследований активированного фенотипа T-клеток и секвенирования репертуаров TCR. В среднем у каждого из проанализированных доноров было обнаружено 2000 клонов, отвечающих на вакцинацию от желтой лихорадки. Ответившими клонами считались клоны, которые: а) увеличены в активированной фракции на день 14 по сравнению с несортированной фракцией в этот же день; б) отсутствует во фракции памяти на день 0. Авторам не удалось найти какие-либо особенности в аминокислотных последовательностях CDR3, использовании V- и J-сегментов у отвечающих на вакцинацию клонов.

В другом исследовании было показано чрезвычайно неравномерное использование TRAV сегментов у NS4B₂₁₄₋₂₂₂ специфичных клеток [Bovay и др., 2018]. Было обнаружено, что более 50% мультимер-специфичных клеток имеют сегмент TRAV12-2, в то время как в общей популяции CD8 он находится лишь у 12% клеток. Кроме того, длина CDR3 α -цепи TCR у этих клеток преимущественно составляла 9 а.о. На основе молекулярного моделирования комплекса

TCR-рМНС было показано, что в данном случае CDR1, кодируемый TRAV, принимает непосредственное участие в узнавании пептида и определяет высокое сродство TCR к NS4B₂₁₄₋₂₂₂. В отличие от α -цепей TCR мультимер-специфических клеток, в TCR β не обнаруживается каких-либо предпочтений в использовании отдельных V- и J-сегментов.

В последнее время особый интерес представляет недавно открытая популяция памяти Tscm. Было проведено секвенирование РНК на уровне отдельных мультимер-специфических клеток, собранных через 9 месяцев после первичной вакцинации YFV17D [Afik и др., 2017]. Антиген-специфические клетки кластеризуются на две группы по профилю экспрессии: EM и Tscm. Эти две группы клеток не отличаются по уровню экспрессии TCR, гидрофобности CDR3 или силе связывания с МНС-мультимером. Однако, аминокислотная последовательность CDR3 Tscm оказалась достоверно длиннее, чем у EM, причем как для α так и для β -цепи TCR. Более того, отличия в длине связаны непосредственно с количеством вставочных букв в CDR3.

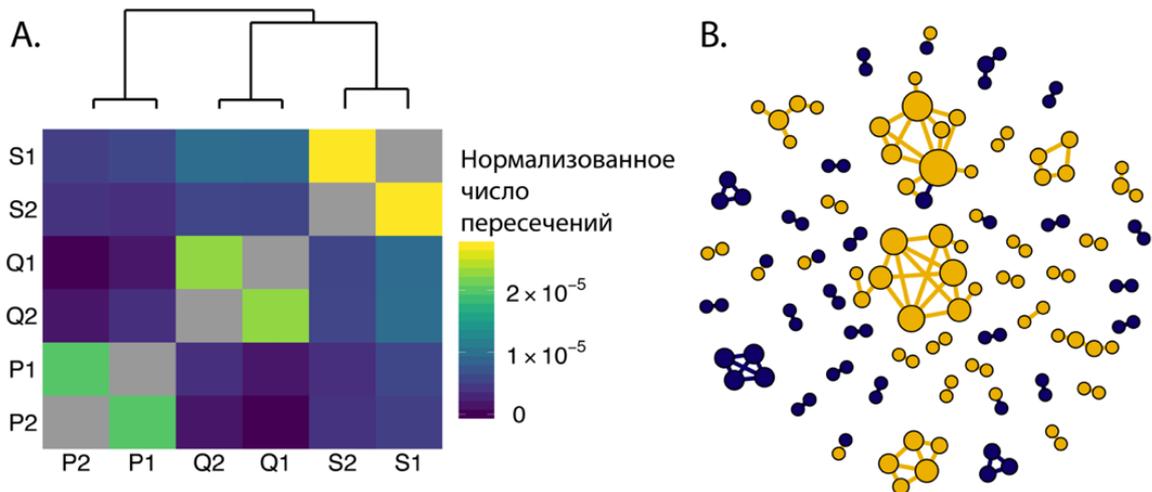


Рис. 7. Конвергентная рекомбинация и последующая селекция на одинаковый антигенный стимул приводит к появлению похожих TCR в репертуарах у идентичных близнецов (А) и внутри репертуара одного донора (В). А. Матрица пересечений, показывает, что количество похожих ЖЛ-реактивных клонов у идентичных близнецов больше, чем у неродственных доноров. В. Граф для 1000 самых представленных TCR β на пике ответа против вируса ЖЛ у одного донора. Каждая вершина соответствует нуклеотидной последовательности CDR3, они соединены ребром, если различаются не более чем двумя аминокислотными заменами. Желтые вершины соответствуют ЖЛ-реактивным TCR. На графе не представлены TCR не имеющие ребер.

При изучении вакцинации с помощью высокопроизводительного секвенирования можно не только оценить силу ответа, но и сравнивать аминокислотные последовательности TCR

отвечающих клонотипов у разных доноров. Нами было показано, что у идентичных близнецов можно обнаружить статистически больше похожих клонов, отвечающих на вирус ЖЛ, чем у неродственных доноров (Рисунок 7А) [Pogorelyu и др., 2018b]. Однако, количество таких схожих клонов даже у идентичных близнецов очень мало. Таким образом, мы показали, что каждый человек очень индивидуально отвечает на вакцину и формирует свой набор связывающих этот антиген TCR. При сравнении TCR тысячи самых представленных клонов на пике ответа, оказалось, что некоторые TCR, специфичные к вирусу ЖЛ, образуют большие кластеры похожих аминокислотных последовательностей (Рисунок 7В). При этом TCR, специфичные к вирусу ЖЛ, похожи только на TCR, специфичные к вирусу ЖЛ, но не на другие клоны в репертуаре. Такая картина может наблюдаться в случае конвергентной рекомбинации таких TCR и последующей селекции схожих клонотипов в ответ на вакцинацию.

2.4.5. Иммунный ответ на ревакцинацию от желтой лихорадки

До 2013 года по рекомендациям Всемирной Организации Здравоохранения для обеспечения иммунной защиты от вируса желтой лихорадки необходимо проводить ревакцинацию каждые 10 лет. В настоящее время считается, что одной вакцинации достаточно для пожизненного иммунитета против этого вируса. Такие изменения в рекомендациях связаны с тем, что за все время использования вакцины было зарегистрировано всего 32 случая возникновения заболевания у вакцинированных людей [Watson, Klimstra, 2017] и это не было связано со временем, прошедшим после вакцинации. Кроме того, известно, что достаточно высокий титр антител сохраняется у вакцинированных людей в течении минимум 30 лет [Poland и др., 1981].

Однако, имеется всего несколько исследований, непосредственно посвященных иммунному ответу на повторную вакцинацию против ЖЛ. Интересно, что несмотря на то, что всего у нескольких доноров удалось детектировать мультимер-специфические клетки до вторичной вакцинации, оказалось, что иммунный ответ на ревакцинацию слабый. Количество активированных CD4 и CD8 клеток на пике ответа не превышает 1%, в то время как для первичной вакцинации достигает в среднем 6% [Kongsgaard и др., 2017]. Количество мультимер-специфических клеток также изменяется незначительно в ответ на повторную вакцинацию [Kongsgaard и др., 2017; Wieten и др., 2016]. Не было обнаружено связи между титром нейтрализующих антител и силой ответа на ревакцинацию от желтой лихорадки у людей. Сравнение фенотипов Т-клеток, специфичных к вирусу ЖЛ, у группы людей, проходивших одну вакцинацию и у группы людей с несколькими вакцинациями против ЖЛ, не показало значимых отличий [Wieten и др., 2016].

3. Материалы и методы

3.1. Материалы

3.1.1. Использованное оборудование и расходные материалы

Автоматические одноканальные микропипетки (Gilson, Франция; Eppendorf, Германия); автоматические многоканальные микропипетки (Gilson, Франция; Eppendorf, Германия); электронный пипеточный дозатор Swiftpet Pro (HTL, Польша); электронный пипеточный дозатор assu-jet (Brand, Германия); центрифуги Eppendorf 5415R и 5804R (Eppendorf, Германия); автоматический термоциклер DNAEngine (Bio-Rad, США); автоматический термоциклер T100 (Bio-Rad, США); станция для работы с единичными клетками и молекулами Chromium Controller (10X Genomics, США); термостат Термит (ДНК-технология, Россия); камера для электрофореза (Хеликон, Россия); источник питания Эльф-4 (ДНК-технология, Россия); смеситель ротационный RM-1L (Elmi, США); качалка Bio shaker 3D (Biosan, Латвия); система для клеточного сортирования BD FACSAria III (BD Bioscience, США); флуориметр Qubit 2.0 (Invitrogen/Life Technologies, США); автоматический клеточный счетчик Luna-II (Logos Biosystems, Корея); бокс для ПЦР с УФ-лампой (Ламинарные системы, Россия); магнитные штативы для пробирок 0.5 и 1.5 мл (Евроген, Россия); миксер лабораторный Bio Vortex V1 (Biosan, Латвия); перчатки нитриловые (NitriMAX, Россия); 0.5 мл пробирки для ПЦР (SSI, США); микроцентрифужные пробирки объемом 1.5 и 2 мл (SSI, США); фильтрованные наконечники для микропипеток Vertex (SSI, США); вакуумные пробирки для сбора крови с ЭДТА Vacuette (Greiner, Австрия); пробирки объемом 0.2 мл в стрипах по 8 штук (SSI, США); пластиковые пробирки на 15 и 50 мл (Eppendorf, США); серологические пипетки на 2 и 10 мл (Eppendorf, США); пробирки круглодонные объемом 5 мл (SPL Lifesciences, Корея); система автоматизированного электрофореза TapeStation (Agilent, США)

3.1.2. Использованные реактивы

Агароза для электрофореза (Promega, США); изопропиловый спирт; хлороформ; этиловый спирт; вазелиновое масло; глицерин (Sigma, США); смесь dNTP (Евроген, Россия); смесь ДНК-полимераз и буфер для ПЦР Q5 (NEB, США); обратная транскриптаза и буфер для синтеза первых цепей кДНК SmartScribe (Clontech, США); урацил-ДНК-гликозилаза (NEB, США); смесь полимераз и буфер для ПЦР Encyclo (Евроген, Россия); набор для обратной транскрипции MMLV (Евроген, Россия); набор для выделения РНК из клеток и тканей RNAeasy Micro (Qiagen, Голландия); Trizol (Invitrogen, США); коосадитель нуклеиновых кислот Satellite

Red (Евроген, Россия); набор для выделения ДНК из геля и очистки продуктов ПЦР QIAquick (Qiagen, Голландия); магнитные частицы для очистки ДНК AmpureXP (Beckman Coulter, США); набор для позитивной селекции CD4⁺ клеток Dynabeads (Invitrogen, США); набор для позитивной селекции CD8⁺ клеток Dynabeads (Invitrogen, США); набор для иммуномагнитной селекции Ultra-Pure Anti-PE MicroBeads (Miltenyi, США); раствор фикоλλα (ПанЭко, Россия); интеркалирующий краситель SYBR Green I (Евроген, Россия); этилендиаминтетраацетат (ЭДТА) (Sigma, США); PBS, концентрат фосфатно-солевого буферного раствора, сухой (ПанЭко, Россия); бромистый этидий (Helicon, Россия); RNAlator (Thermo Fisher Scientific, США); фетальная сыворотка плода коровы (FCS) (ПанЭко, Россия); пропидий йодид (Thermo Fisher Scientific, США); набор праймеров Nextera Index Kit (Illumina, США); набор для измерения концентрации ДНК Qubit DNA HS Kit (Thermo Fisher Scientific, США); набор для измерения концентрации РНК Qubit RNA HS Kit (Thermo Fisher Scientific, США); маркеры длин ДНК 1 kb и 100+ bp (Евроген, Россия); Smart-Seq v4 Ultra-Low Input RNA (Takara Bio, США); набор для приготовления библиотек для секвенирования Nextera XT (Illumina, США); Chromium Single Cell 5' Library & Gel Bead Kit (10x Genomics, США), Chromium Single Cell A Chip Kit (10x Genomics, США), Chromium Single Cell V(D)J Enrichment Kit Human T-cell (10x Genomics, США), Chromium Single Cell 3'/5' Library Construction Kit (10x Genomics, США), Chromium i7 Multiplex Kit (10x Genomics, США).

Антитела: мышинные антитела к человеческим CD3 клон UCNT1, меченные eFluor450 (eBioscience, США); мышинные антитела к человеческим CD3 клон UCNT1, меченные FITC (eBioscience, США); мышинные антитела к человеческим CD8 клон 3B5, меченные FITC (eBioscience, США); мышинные антитела к человеческим CD45RA клон HI100, меченные eFluor450 (eBioscience, США); крысиные антитела к человеческим CCR7 клон 3D12, меченные Alexa647 (BD Pharmingen, США), мышинные антитела к человеческим CD95 клон DX2, меченные PE (eBioscience, США), HLA-A*0201/LLWNGPMAV декстрамер, меченный PE (Immudex, США).

3.1.3. Буферные растворы

Буфер PBS (1x) - 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.47mM KН₂PO₄, 4.29mM Na₂HPO₄·7H₂O, pH 7.3-7.5 (Amresco, США)

Буфер DynaBeads PBS (1x), 0.1% BSA, 2 mM EDTA, pH 7.4.

Буфер TBE (5x) - 45 mM Трис, 45 mM Н₃ВО₃, 10 mM ЭДТА (pH 8.3)

Буфер для нанесения образцов ДНК на агарозный гель – 0.1% бромфеноловый синий, 0.1% ксиленцианол, 30 % глицерин.

3.2. Методы

3.2.1. Доноры и образцы крови

Образцы венозной крови были получены от двух здоровых доноров М1 и Р30 (мужчина 27 лет и мужчина 40 лет) в различных временных точках до и после вакцинации против вируса желтой лихорадки. Донор М1 был привит от желтой лихорадки впервые в ходе эксперимента, а затем был привит второй раз через 1.5 года после первой иммунизации. Донор Р30 был впервые вакцинирован против желтой лихорадки 30 лет назад, а в ходе эксперимента получил вторую иммунизацию. Добровольная вакцинация и забор крови производился в специализированных медицинских учреждениях после подписания информированного согласия.

В каждой временной точке было собрано 8 мл крови для двух биологических повторностей тотальной фракции мононуклеаров периферической крови (РВМС), 4 мл для выделения CD4 и CD8 Т-клеток на магнитных частицах. Для получения фракций Т-клеток памяти использовали 12 мл крови и по 8 мл крови использовали для получения эпитоп-специфических CD8 Т-клеток после вакцинации. Для проведения эксперимента по секвенированию транскриптома и полных $\alpha\beta$ TCR репертуаров отдельных клеток через 1.5 года после первичной вакцинации использовали 60 мл крови. Вся кровь собиралась в вакуумные пробирки с ЭДТА Vacuette (Greiner, Австрия) и была использована для выделения РВМС не позднее чем через 3 часа после забора.

3.2.2. Выделение тотальной фракции РВМС

Первой стадией при работе со всеми образцами крови было выделение РВМС методом центрифугирования в градиенте фикола плотностью $1,077 \text{ г/см}^3$ (ПанЭко, Россия). Кровь разводили в 3–4 раза однократным раствором PBS и аккуратно наслаивали на 10–15 мл фикола. Центрифугировали пробирки на центрифуге с бакет-ротором Eppendorf 5804R (Eppendorf, Германия) при комнатной температуре, ускорении 400 g в течении 30 минут при минимальных разгоне и торможении. Аккуратно отбирали интерфазу в отдельную пробирку на 50 мл и добавляли 30 мл PBS. Центрифугировали 15 минут при комнатной температуре и ускорении 450 g. Супернатант отбирали и ресуспендировали клеточный осадок в 15–30 мл PBS. Центрифугировали 15 минут при комнатной температуре и ускорении 450 g. Супернатант выбрасывали, осадок заливали 1 мл реагента Trizol (для тотальных фракций РВМС) или ресуспендировали в небольшом объеме соответствующего буфера для окрашивания антителами или выделения CD4 и CD8 Т-клеток на магнитных частицах.

3.2.3. Выделение CD4 и CD8 Т-клеток

Выделение CD4 и CD8 Т-клеток проводили с помощью наборов для позитивной селекции этих фракций на магнитных частицах Dynabeads (Invitrogen, США). Для получения фракций CD4/CD8 Т-лимфоцитов использовали РВМС, выделенные из 4 мл венозной крови. В пробирку на 1.5 мл добавляли 25 мкл анти-CD8 магнитных частиц и промывали 1 мл Dynabeads буфера. Пробирку помещали в магнитный штатив на 1–3 минуты и отбирали супернатант. К магнитным частицам добавляли 1 мл РВМС в холодном Dynabeads буфере, аккуратно перемешивали. Клетки с магнитными частицами помещали на ротационный смеситель RM-1L (Elmi, США) и перемешивали на медленной скорости на +4°C в течении 30 минут. После инкубации клетки ставили в магнитный штатив на 2 минуты. В это время 25 мкл анти-CD4 магнитных частиц промывали Dynabeads буфером. Супернатант, отобранный из пробирок с анти-CD8 магнитными частицами, добавляли к анти-CD4 частицам, помещали на ротационный смеситель и перемешивали на медленной скорости на +4°C градусах в течении 30 минут. Анти-CD8 частицы с клетками промывали 2 раза буфером Dynabeads. Клеточный осадок вместе с магнитными частицами заливали 700 мкл реагента Trizol и хранили на –70°C. После завершения инкубации клеток с анти-CD4 магнитными частицами выполнялась такая же процедура.

3.2.4. Выделение субпопуляций Т-клеток памяти

Субпопуляции клеток памяти получали с помощью флуоресцентно-активируемого клеточного сортирования (FACS). Фракция РВМС из 12 мл крови окрашивалась смесью антител: анти-CD3-FITC (eBioscience, США), анти-CD45RA-eFluor450 (eBioscience, США), анти-CCR7-Alexa647 (BD Pharmingen, США), анти-CD95-PE (eBioscience, США) в соответствии с протоколом производителя. Были выделены следующие субпопуляции клеток: центральная память (CM) CD3+CD45RA–CCR7+, эффекторная память (EM) CD3+CD45RA–CCR7–, терминально-дифференцированная эффекторная память (EMRA) CD3+CD45RA+CCR7–, наивные клетки CD3+CD45RA+CCR7+, “наивная” память (Tscm) CD3+CD45RA+CCR7+CD95+. Клетки сортировали в 100 мкл раствора RNAlater (Thermo Fisher Scientific, США) и хранили на –70°C до выделения РНК.

3.2.5. Выделение CD8 Т-клеток, специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса желтой лихорадки

Для получения клеток, специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса желтой лихорадки NS4B₂₁₄₋₂₂₂, PBMC, выделенные из 8 мл крови, окрашивали HLA-A*02/LLWNGPMAV декстрамером, меченным PE (Immudex, США). Для получения NS4B₂₁₄₋₂₂₂ специфичных клеток донора M1 через 1.5 года после вакцинации использовали PBMC из 60 мл крови. Выделенные PBMC переводили в PBS с 5% фетальной сыворотки плода коровы (FCS). Центрифугировали 10 минут на комнатной температуре и ускорении 300 g. Каждые 10–12 миллионов клеток ресуспендировали в 40 мкл PBS с 5% FCS, переносили в круглодонные пробирки для сортировки и добавляли 12 мкл декстрамера. Инкубировали 20 минут в темноте на комнатной температуре. После завершения инкубации клетки переносили на лед и добавляли анти-CD3-eFluor450 (Invitrogen, США) и анти-CD8-FITC антитела (Invitrogen, США) из расчета 5 мкл на 10 миллионов клеток. Инкубировали 20 минут на льду. Промывали дважды холодным PBS с 5% FCS и центрифугировали при +4°C по 5 минут с ускорением 300 g. При низкой концентрации эпитоп-специфических клеток (день 0 вторая вакцинация донора M1) для увеличения скорости FACS предварительно проводили обогащение эпитоп-специфическими клетками с помощью набора для иммуномагнитной селекции Ultra-Pure Anti-PE MicroBeads (Miltenyi, Германия) по протоколу производителя (Рисунок 8). Перед FACS клеток, используемых для проведения секвенирования транскриптома единичных клеток, был дополнительно добавлен 1 мкл пропидий йодида (Thermo Fisher Scientific, США) для окрашивания мертвых клеток.

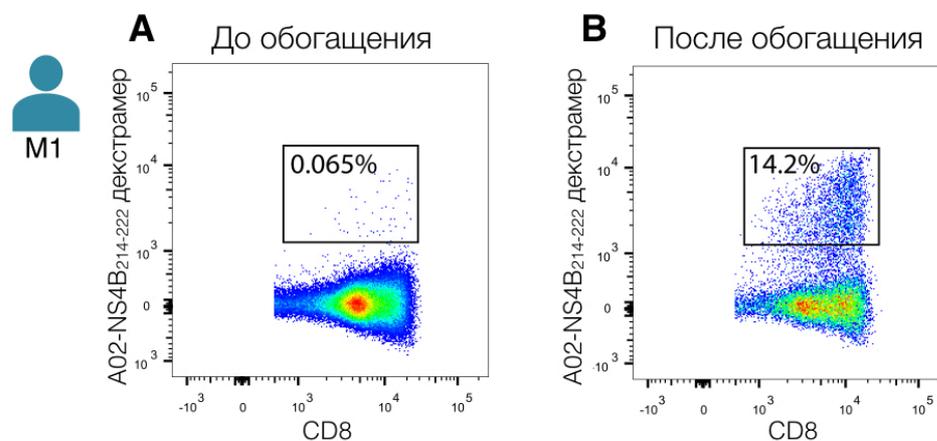


Рис. 8. Количество NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных Т-клеток до (А) и после (В) обогащения на анти-PE магнитных частицах. Проценты показывают долю NS4B-специфических Т-клеток от всех CD3+CD8+ клеток.

3.2.6. Выделение РНК

Выделение РНК из тотальных фракций PBMC, CD4 и CD8 и NS4B-специфичных клеток проводилось с помощью реагента Trizol. К одному объему Trizol добавляли $\frac{1}{5}$ объема хлороформа и трясли 1 минуту в руках. Инкубировали образцы 5 минут на комнатной температуре, периодически перемешивая. Пробирки с образцами центрифугировали при $+4^{\circ}\text{C}$ и ускорении 12000 g 15 минут. Верхнюю водную фазу аккуратно отбирали срезанным фильтрованным носом в новую пробирку. К образцу добавляли 0.7–1 мкл соосадителя нуклеиновых кислот Satellite Red (Евроген, Россия) и перемешивали пипетированием. К образцам добавляли $\frac{1}{2}$ объема изопропанола на каждый объем реагента Trizol и перемешивали переворачиванием. После 15 минутной инкубации на комнатной температуре образцы центрифугировали при $+4^{\circ}\text{C}$ и максимальном ускорении 15 минут. Супернатант отбирали и выкидывали, осадок РНК промывали 2 раза 80% этанолом, центрифугировали оба раза при $+4^{\circ}\text{C}$ и максимальном ускорении 10 минут. После последней промывки спирт отбирали досуха, осадок РНК сушили с открытыми крышками при 50°C в течении 10 минут. Осадок ресуспендировали в 10–20 мкл воды без РНКаз и прогревали на 55°C 5 минут для полного растворения. 1 мкл РНК разводили в 10 раз и использовали 2 мкл для измерения на флуориметре Qubit (Invitrogen/Life Technologies, США) и 8 мкл для оценки сохранности РНК наносили на гель. Оставшуюся РНК хранили при -70°C .

Выделение РНК из фракций Т-клеток памяти проводили с помощью набора для выделения РНК из клеток и тканей RNeasy Micro (Qiagen, Голландия) по протоколу производителя. К клеткам в буфере RLT добавляли 1 объем свежего 70% этанола, тщательно перемешивали и переносили на RNeasy MinElute колонку. Центрифугировали 30 секунд при ускорении 12000 g, центрифугат выкидывали. Добавляли на колонку 700 мкл буфера RW1, центрифугировали 30 секунд при ускорении 12000 g, центрифугат выкидывали. Добавляли на колонку 500 мкл буфера RPE, центрифугировали 30 секунд при ускорении 12000 g, центрифугат выкидывали. Промывали колонку 500 мкл 80% этанола, центрифугировали 30 секунд при ускорении 12000 g. Перемещали колонку в новую пробирку и центрифугировали колонку с открытой крышкой 5 минут на максимальных оборотах для удаления спирта с мембраны. Переносили колонку в пробирку на 1.5 мл, добавляли 14 мкл воды без РНКаз непосредственно на мембрану колонки, центрифугировали 1 минуту на максимальных оборотах. Полученную РНК хранили при -70°C .

3.2.7. Определение HLA-генотипов доноров

Для определения HLA аллелей доноров использовали небольшую аликвоту РНК, выделенную из тотальной фракции РВМС. С помощью набора для обратной транскрипции MMLV (Евроген, Россия) проходил синтез первых цепей кДНК со специфических праймеров, комплементарных высококонсервативным участкам локусов *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DQB*, *HLA-DRB* (Приложение 1).

В реакцию синтеза входит:

- 50–300 нг РНК в объеме не более 4 мкл
- 5x MMLV буфер для синтеза первых цепей; 2 мкл
- DTT 20 ммоль; 1 мкл
- dNTP 10 ммоль каждого; 1 мкл
- Смесь праймеров для синтеза; 1 мкл
- Обратная транскриптаза MMLV; 1 мкл
- Вода без РНКаз до 10 мкл.

Синтез первых цепей проводили при 42°C в термоциклере с нагревающейся крышкой в течении 1.5 часов.

Далее первые цепи кДНК амплифицировали с использованием праймеров, комплементарных участкам экзонов генов HLA I и II классов (Приложение 1). Каждая кДНК амплифицировалась с 8 отдельными смесями праймеров в 8 параллельных реакциях ПЦР. Концентрации праймеров в каждой из 8 смесей указаны в Приложении 1.

В состав каждой реакции входит:

- кДНК матрица; 0.25 мкл
- 5x буфер для ПЦР Encyclo; 3 мкл
- dNTP 10 ммоль каждого; 0.2 мкл
- Смесь праймеров для ПЦР1; 1 мкл
- 50x смесь полимераз Encyclo; 0.3 мкл
- mQ до 15 мкл.

Температурный режим амплификации:

95°C	1 минута	} 28 циклов
95°C	20 секунд	
63°C	40 секунд	
72°C	1 минута	

Продукты первой ПЦР для всех 8 реакций для каждого донора смешивали по объему. Полученную смесь разводили в 100 раз и использовали в качестве матрицы для второй ПЦР.

Вторая ПЦР проводилась с использованием набора праймеров Nextera Index Kit (Illumina, США), содержащих все необходимые нуклеотидные последовательности для секвенирования. Для каждого из доноров использовалось уникальное сочетание адаптеров Nextera N7XX и Nextera N5XX.

Каждая реакция второй ПЦР содержала:

Разведенный продукт ПЦР1; 1 мкл
 5x буфер для ПЦР Encyclo; 5 мкл
 dNTP 10 ммоль каждого; 0.5 мкл
 Адаптер Nextera N7XX 5 пкмоль; 1 мкл
 Адаптер Nextera N5XX 5 пкмоль; 1 мкл
 50x смесь полимераз Encyclo; 0.5 мкл
 mQ до 25 мкл.

Температурный режим амплификации:

94°C	20 секунд	} 9 циклов
55°C	20 секунд	
72°C	1 минута	

Очистка полученных библиотек проводилась 0.8 объемами магнитных частиц Ampure XP (Beckman Coulter, США). Концентрации определялись с использованием флуориметра Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США) и набора для измерения концентрации ДНК Qubit DNA HS Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

Библиотеки секвенировали на платформе Illumina MiSeq с длиной чтения 2x250 нт. Обработка данных секвенирования проводилась в среде программирования R с помощью разработанного автоматизированного алгоритма (<https://github.com/asya-minervina/HLA>).

3.2.8. Приготовление библиотек кДНК α и β -цепей TCR

Для получения библиотек α и β -цепей TCR использовали ранее разработанный в лаборатории протокол [Pogorelyu и др., 2017] с некоторыми изменениями. На первой стадии с полученной РНК проводили синтез кДНК с использованием обратной транскриптазы SmartScribe (Clontech, США). Для затравки синтеза использовали смесь праймеров, комплиментарных константным сегментам α и β -цепей TCR (Таблица 1). В отличие от 3'-конца, на 5'-конце матрицы отсутствует какая-либо консервативная последовательность нуклеотидов, поэтому для внедрения туда сайта отжига праймера для дальнейшей амплификации был использован эффект смены матрицы обратной транскриптазой [Zhu и др., 2001]. Олигонуклеотид для смены матрицы (SMART-адаптер) содержит также уникальный

молекулярный идентификатор (UMI) – последовательность из вырожденных нуклеотидов и индекс образца. Последовательности UMI метят каждое событие синтеза и используются для более точного подсчета количества клонов, потому что не зависят от перекосов, вызванных амплификацией в ходе дальнейших ПЦР. Кроме того, UMI используются для коррекции ошибок секвенирования при составлении консенсусных последовательностей клонотипов (см. Первичный анализ данных секвенирования).

Каждая реакция синтеза содержала:

- РНК не более 500 нг
- 5x SmartScribe буфер; 2 мкл
- DTT 20 ммоль; 1 мкл
- dNTP 10 ммоль каждого; 1 мкл
- Смесь праймеров BCuniR4vvshort и TRACR2 10 пкмоль каждого
- SMART-адаптер 10 пкмоль
- mQ до объема 10 мкл.

Синтез первых цепей проводили под вазелиновым маслом при 42°C в термостате в течении 1.5 часов.

Затем в каждую реакцию синтеза добавляли 20 мкл воды без РНКаз и 0.7 мкл 5 ед/мкл дезоксиурацилгликозилазы (UDG, NEB, США) для разрушения SMART-адаптера и инкубировали 30 минут при 37°C. После окончания инкубации образцы очищали с помощью набора QIAquick для очистки ДНК (Qiagen, Голландия) по протоколу производителя. Дальнейшая амплификация кДНК образцов проходила в две стадии.

Реакция первой ПЦР содержала:

- Матрица кДНК (эквивалент не более ½ синтеза)
- 5x Q5 буфер (NEB, США); 3 мкл
- Смесь праймеров Sm1msq, RPacj, RPbcj1, RPbcj2 по 5 пкмоль каждого
- dNTP 10 ммоль каждого; 0.2 мкл
- Q5 полимеразы (NEB, США); 0.15 мкл
- mQ до объема 15 мкл

Температурный режим амплификации:

95°C	1 минута	} 16–20 циклов
94°C	20 секунд	
60°C	15 секунд	
72°C	1 минута	

ПЦР продукты очищали на колонках QIAquick для очистки ДНК (Qiagen, Голландия) по протоколу производителя, элюция 80 мкл буфера EB.

На стадии второй ПЦР в образцы вводили нуклеотидные последовательности необходимые для секвенирования на платформе Illumina и индексы образцов Illumina Truseq. Каждая реакция второй ПЦР содержала:

ПЦР-продукт; 1.5 мкл

5x Q5 буфер (NEB, США); 5 мкл

Праймер Sm-out-msq 5 пкмоль

IL-acj-ind (для библиотек α -цепей TCR) 5 пкмоль

IL-bcj-ind (для библиотек β -цепей TCR) 5 пкмоль

dNTP 10 ммоль каждого; 0.2 мкл

Q5 полимеразы (NEB, США); 0.25 мкл

mQ до объема 25 мкл.

Температурный режим амплификации:

95°C	1 минута	} 9–18 циклов
94°C	20 секунд	
60°C	15 секунд	
72°C	40 минута	

ПЦР продукты очищали 0.7 объемами магнитных частиц AmpureXP (BeckmanCoulter, США) по протоколу производителя. Концентрацию полученных библиотек измеряли на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США) с помощью набора Qubit DNA HS Kit (ThermoFisherScientific, США). Смесь библиотек наносили на 1% агарозный гель и вырезали необходимую полосу длиной 500-800 пн. Выделение ДНК из геля проводили с помощью набора QIAquick для очистки ДНК (Qiagen, Голландия) по протоколу производителя. Качество и количество полученных библиотек оценивали с помощью прибора TapeStation (Agilent, США). Библиотеки были секвенированы на платформах Illumina HiSeq 2500 с длиной чтения 2x100 пн и Illumina NovaSeq с длиной чтения 2x150 пн с помощью специализированного набора праймеров (Таблица 1).

Таблица 1. Олигонуклеотиды использованные для приготовления библиотек α и β -цепей TCR

Название	Нуклеотидная последовательность
Праймеры и адаптеры для синтеза кДНК (где INDEX1 – последовательность баркода)	
BC_uni_vvshort	TGGAGTCATTGA
TRAC_R2	ACACATCAGAATCCTTACTTTG
SMART-MK-indX	CAGUGGUAUCAACGCAGAGUACNNNNNNUINDEX1UNNNNNNUCTT (rG)

Праймеры для первой ПЦР	
Sm1msq	GAGATCTACACGAGTCAGCAGTGGTATCAACGCAG
RPbcj1	CGACTCAGATTGGTACACCTTGTTCAGGTCCTC
RPbcj2	CGACTCAGATTGGTACACGTTTTTCAGGTCCTC
RPacj	CGACTCAAGTGTGTGGGTCAGGGTTCTGGATAT
Праймеры для второй ПЦР (где INDEX2 – стандартная последовательность баркода Illumina TrueSeq)	
Sm-out-msq	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGAGTCA
Il-bcj-indX	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATINDEX2CGACTCAGATTGGTAC
Il-acj-indX	CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATINDEX2CGACTCAAGTGTGTGG
Праймеры для секвенирования	
IL-AIRP	ATATCCAGAACCCTGACCCACACACTTGAGTCG
IL-IRP-b1	GAGGACCTGAAAAACGTGTACCAATCTGAGTCG
IL-IRP-b2	GAGGACCTGAACAAGGTGTACCAATCTGAGTCG
IL-RP1-msq	ACACGAGTCAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC
IL-RP2-b1	CGACTCAGATTGGTACACGTTTTTCAGGTCCTC
IL-RP2-b2	CGACTCAGATTGGTACACCTTGTTCAGGTCCTC
IL-ARP2	CGACTCAAGTGTGTGGGTCAGGGTTCTGGATAT

3.2.9. Секвенирование тотальной мРНК (RNAseq)

Для образцов РНК, полученных из малых количеств клеток, вместо описанного выше протокола получения библиотек TCR α и β -цепей использовали набор Smart-Seq v4 Ultra-Low Input RNA (Takara Bio, США) для получения библиотек тотальной мРНК для секвенирования. Библиотеки получали по стандартному протоколу производителя. Фрагментация библиотек и введение адаптеров, необходимых для секвенирования проводили с использованием набора Nextera XT (Illumina, США) по протоколу производителя. Полученные библиотеки секвенировали на платформе Illumina HiSeq 2500 с длиной чтения 2x100 пн.

3.2.10. Секвенирование транскриптома и $\alpha\beta$ TCR репертуаров единичных клеток

Для секвенирования единичных клеток, специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса желтой лихорадки донора M1 были использованы наборы фирмы 10x Genomics, позволяющие получить парные $\alpha\beta$ TCR репертуары и библиотеки тотальной мРНК. Библиотеки получали по протоколу производителя. На первой стадии получали эмульсию клеток с частицами, покрытыми уникальными клеточными баркодами с использованием набора

Chromium Single Cell 5' Library & Gel Bead Kit, планшета Single Cell A Chip и прибора Chromium (10x Genomics, США). Получение библиотек парных $\alpha\beta$ TCR репертуаров проводили с использованием набора Chromium Single Cell V(D)J Enrichment Kit (10x Genomics, США) для Т-клеток человека. Библиотеки мРНК этих же клеток были получены с помощью набора Chromium Single Cell 5' Library Construction Kit (10x Genomics, США). Введение адаптеров для секвенирования к образцам проводилось с использованием набора Chromium i7 Multiplex Kit (10x Genomics, США). Качество и количество полученных библиотек оценивалось на приборе TapeStation (Agilent, США). Библиотеки секвенировали на платформе Illumina HiSeq 3000 с длиной чтения 2x150 пн. Первичная обработка данных проведена с использованием программного обеспечения Cell Ranger (10x Genomics, США).

3.2.11. Электрофорез и вырезание библиотек из геля

Электрофорез РНК и ПЦР продуктов проводили в 0.8-1.2% агарозном геле на 0.5x буфере TBE с бромистым этидием. Камеру для электрофореза заполняли 0.5x буфером TBE. Перед нанесением на гель образец смешивали с буфером для нанесения. Электрофорез образцов проводили при напряжении 140В в течении 30–40 минут. Для определения длин фрагментов использовали маркеры длин ДНК 1 kb и 100+bp (Евроген, Россия). При необходимости очистки ПЦР продуктов из геля вместо бромистого этидия использовали SybrGreen для сохранения нативности ДНК.

3.2.12. Очистка кДНК и ПЦР продуктов на колонках

Очистка первых цепей кДНК и продуктов первой ПЦР проводилась на колонках QIAquick (Qiagen, Голландия) по протоколу производителя. ПЦР продукт смешивали с 5 объемами буфера РВ, тщательно перемешивали и переносили на колонку. Центрифугировали в течении 1 минуты при ускорении 12000 g, центрифугат удаляли. Колонку промывали 750 мкл буфера РЕ, центрифугировали 1 минуту при ускорении 12000 g, центрифугат удаляли. Для удаления остатков РЕ пустую колонку центрифугировали на максимальных оборотах 1 минуту. Колонки переносили в чистые пробирки объемом 1.5 мл. Необходимое количество буфера ЕВ (минимум 30 мкл) наносили на мембрану колонки и инкубировали 1 минуту. Центрифугировали 1 минуту при ускорении 12000 g. Полученный центрифугат хранили при –70С.

Очистку ПЦР продуктов из геля также проводилась с использованием колонок QIAquick. Для этого к каждому объему агарозного геля добавляли 1 объем буфера QG и

инкубировали, периодически помешивая, до полного растворения агарозы. Затем в смесь добавляли один объем изопропанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 1 минуту при ускорении 12000 g, центрифугат удаляли. На колонку добавляли 500 мкл буфера QC, центрифугировали 1 минуту при ускорении 12000 g, центрифугат удаляли. Последующие стадии, начиная с добавления 750 мкл буфера PE, проводились также как при очистке ПЦР-продуктов из раствора.

3.2.13. Очистка на магнитных частицах

Для очистки продуктов второй ПЦР использовали магнитные частицы AmpureXP (Beckman Coulter, США). К образцу добавляли 0.7 объема раствора частиц, тщательно перемешивали пипетированием и инкубировали 10–15 минут на комнатной температуре. Затем пробу ставили в магнитный штатив, инкубировали 3 минуты и отбирали супернатант, не снимая с магнита. После чего частицы промывали 2 раза 200 мкл свежего 80% этанола. Остатки этанола тщательно отбирали, осадок магнитных частиц сушили в течении 10 минут на магните. Вынимали пробирку из магнитного штатива, к осадку добавляли необходимое количество mQ для элюции, перемешивали пипетированием. Инкубировали образец 5 минут на комнатной температуре и затем помещали на магнит на 2 минуты. Супернатант отбирали в чистую пробирку и использовали далее.

3.2.14. Первичная обработка результатов секвенирования

Сырые данные секвенирования обрабатывались специальными программными пакетами MiGEC [Shugay и др., 2014] и MiXCR [Bolotin и др., 2015]. В процессе обработки этими программами происходит коррекция ошибок секвенирования, подсчет уникальных молекулярных баркодов и выравнивание на базу V, D, J сегментов. Результатом этого этапа обработки является получение таблиц («клонсетов»), где для каждой уникальной нуклеотидной последовательности CDR3 указаны: количество UMI; аминокислотная последовательность CDR3; V- D- и J-сегменты, участвовавшие в формировании последовательности. Для получения клонсетов TCR из данных секвенирования тотальной мРНК, данные были обработаны напрямую MiXCR со стандартными параметрами для RNAseq.

3.2.15. Анализ данных секвенирования

Последующий анализ данных проводили в среде программирования R. Для работ с таблицами использовались пакеты *tidyverse* и *data.table*. Работа с нуклеотидными и

аминокислотными последовательностями проводилась с использованием пакета *Biostrings*. Для построения графов последовательностей использовали пакет *igraph*, визуализация графов проводилась с помощью программы *Gephi*. Для поиска значимо изменивших свою концентрацию клонов использовали пакет для поиска дифференциально-экспрессированных генов *edgeR* [Robinson, McCarthy, Smyth, 2010]. Данные секвенирования отдельных клеток анализировали с помощью пакета *Seurat 3.0* [Butler и др., 2018; Stuart и др., 2019]. Подсчет вероятностей сборки TCR проводили с помощью программы *OLGA* [Sethna и др., 2019]. Для построения графиков пользовались пакетом *ggplot2* и его дополнениями. Рисунки были сделаны в программе *Vectornator* и *Adobe Illustrator*. Для анализа данных с FACS использовали программу *FlowJo*.

4. Результаты и обсуждение

4.1. Разработка метода HLA-типирования на основе РНК

Комплекс рМНС является лигандом TCR и непосредственно оказывает влияние на формирование TCR репертуара, как на стадиях селекции в тимусе, так и при селекции на периферии. Поэтому для анализа репертуаров и определения TCR специфичности критично знание аллелей HLA исследуемых доноров. Кроме того, определение аллельных вариантов локуса генов HLA играет важную роль в современной медицинской практике при диагностике заболеваний [Dendrou и др., 2018] и при подборе совместимого донора для трансплантации [Fürst и др., 2013]. Существует множество коммерческих решений для HLA-типирования, однако все они используют геномную ДНК в качестве исходной матрицы для создания библиотек и обладают достаточно высокой стоимостью. Поскольку для секвенирования репертуаров TCR по разработанной ранее технологии [Pogorelyu и др., 2017] используется РНК, для удобства работы требовалось разработать систему HLA-типирования, основанную на РНК и позволяющую с достаточно высокой точностью и при минимальных затратах определять аллели HLA. Помимо удобства с технической стороны, секвенирование только кодирующей части HLA генов (кДНК библиотеки) позволяет с одной стороны существенно снизить необходимые объемы секвенирования, а с другой стороны обеспечить разрешение HLA аллелей с достаточно высокой точностью.

4.1.1. Разработка системы пробоподготовки библиотек кДНК генов HLA

Для решения поставленной задачи была создана и оптимизирована система пробоподготовки кДНК библиотек для основных локусов генов HLA первого и второго класса: *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB*, *HLA-DQB* (Рисунок 9). На первом этапе пробоподготовки происходит синтез кДНК HLA, с помощью смеси праймеров, комплементарных консервативным участкам генов (Приложение 1). Известно, что аллели гена *HLA-C* экспрессируются на более низком уровне, чем другие аллели других генов первого класса [McCutcheon и др., 1995]. Для того, чтобы повысить изначальное количество кДНК матрицы, соответствующей *HLA-C* и улучшить качество типирования, в смесь праймеров для синтеза было добавлено два праймера специфических к аллелям генов *HLA-C*, не имеющих сайтов отжига на *HLA-A* и *HLA-B*.

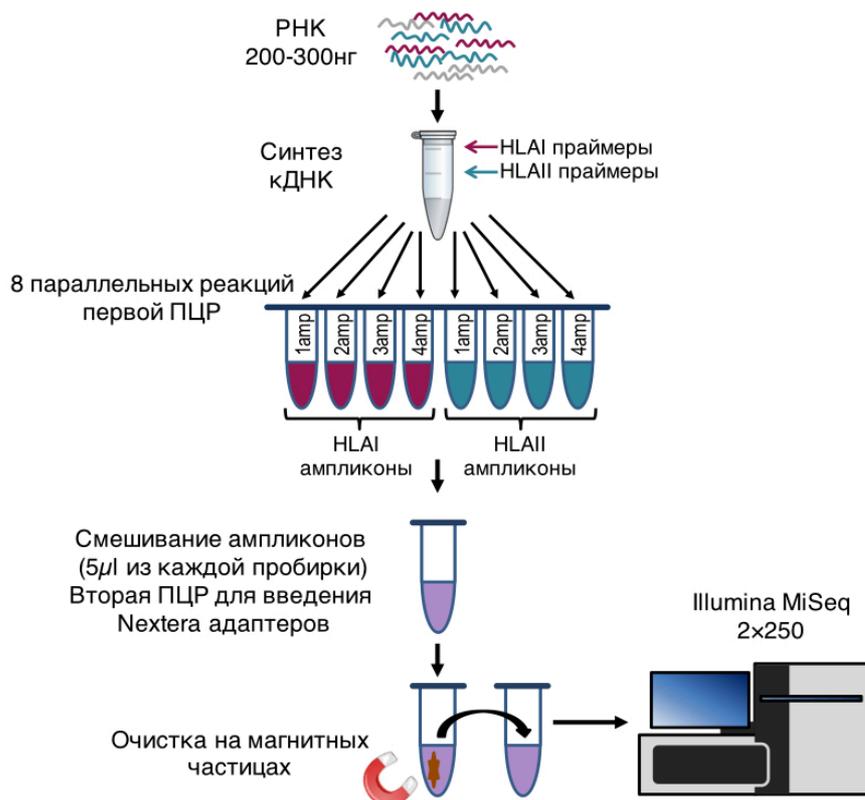


Рис. 9. Схема пробоподготовки кДНК библиотек генов локусов *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DRB*, *HLA-DQB*. На первом этапе происходит синтез кДНК с использованием смеси праймеров, комплементарных последовательностям генов *HLA I* и *II* классов. Полученная кДНК амплифицируется в восьми параллельных реакциях первой ПЦР, где каждая из пробирок содержит праймеры, комплементарные участкам внутри генов *HLA*. Полученные ампликоны смешиваются и используются в качестве матрицы для единой реакции второй ПЦР, где происходит введение *Nextera* адаптеров. Библиотека очищается на магнитных частицах и секвенируется на платформе *Illumina MiSeq* с длиной чтения 2x250 нт.

При разработке системы для амплификации полученных фрагментов кДНК были учтено несколько особенностей высокопроизводительного секвенирования и структуры *HLA* локусов. Так, длина чтения большинства современных секвенаторов платформы *Illumina* не превышает 250 нуклеотидов с каждой стороны библиотеки. Поэтому полученную на стадии синтеза кДНК невозможно прочитать от начала до конца, и следует делить на отдельные перекрывающиеся ампликоны (длиной менее 500 п.о.) (Рисунок 10). При этом полученные ампликоны, должны покрывать участки кДНК локуса с наибольшей вариабельностью, а концы ампликонов находится в участках с большей консервативностью, позволяя использовать небольшое количество праймеров для амплификации всех аллелей. Также полученные ампликоны должны содержать адаптерные последовательности необходимые для секвенирования на платформе *Illumina*. Введение таких адаптеров происходит непосредственно в процессе ПЦР и не требует

дополнительных реакций лигирования. Кроме того, последовательности праймеров были сконструированы таким образом, чтобы обеспечить ненаправленное чтение на Illumina. Другими словами, одни и те же последовательности могут быть по-разному ориентированы в риде 1 и риде 2. Большое аллельное разнообразие генов HLA делает систему очень чувствительной к ошибкам секвенирования. Неориентированное чтение помогает снизить влияние более плохого качества прочтения в риде 2 на определение аллелей. Таким образом для каждого из локусов первого и второго классов HLA была создана система праймеров, обеспечивающая амплификацию четырех перекрывающихся ампликонов, которые затем могут быть прочтены в обоих направлениях. Подробный протокол пробоподготовки описан в разделе Материалы и методы.

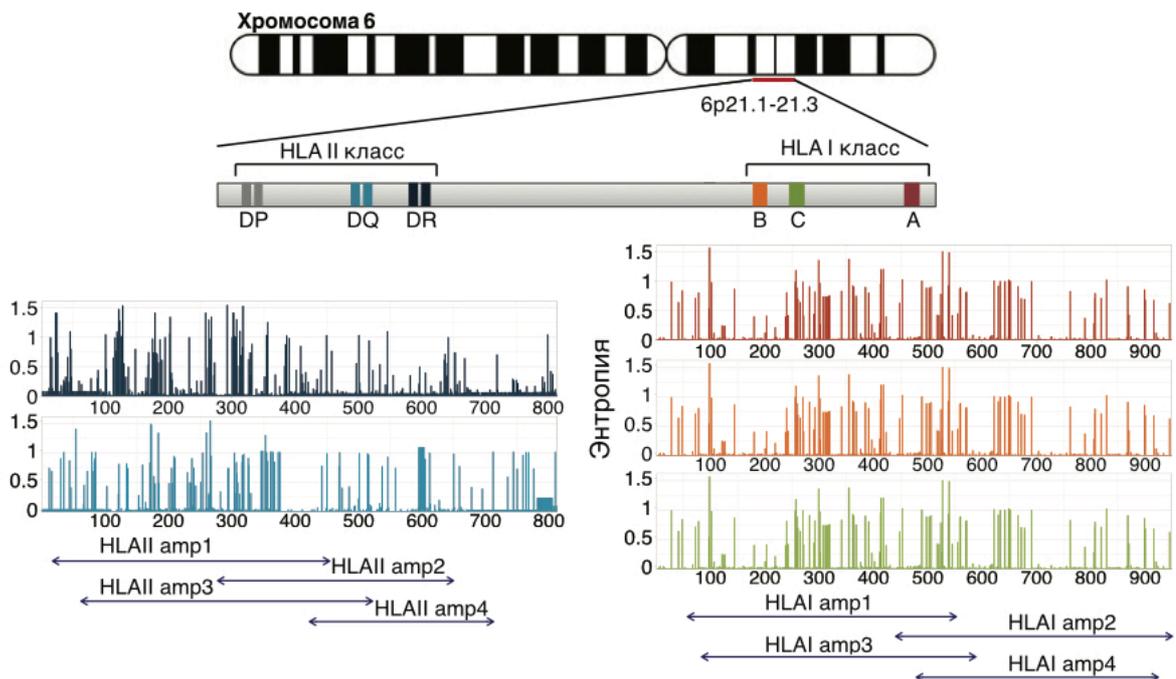


Рис. 10. Схема расположения ампликонов на участках генов HLA I и II классов в разработанной системе. В верхней части показано условное положение локусов HLA на хромосоме. Графики энтропии частот нуклеотидных вариантов показывают степень variability отдельных позиций локусов HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB, HLA-DQB, составленные на основе базы данных аллелей IMGT/HLA. Стрелки внизу графиков энтропии указывают на расположение перекрывающихся ампликонов, использованных для типирования.

4.1.2. Разработка алгоритма анализа данных секвенирования для HLA-типирования

Высокая variability генов HLA, а также наличие большого количества аллелей, отличающихся единственной однонуклеотидной заменой, делает невозможным картирование

полученных после секвенирования нуклеотидных последовательностей стандартными программами и требует разработки оригинального биоинформатического алгоритма.

Разработанный алгоритм можно разделить на два основных этапа. На первом этапе происходит первичная обработка ридов и сборка ампликонов, а на втором этапе непосредственно происходит картирование полученных ампликонов на базу данных IMGT/HLA и определение HLA генотипа. Основная цель первого этапа работы алгоритма – выявление правильных последовательностей, соответствующих аллелям HLA и удаление ошибочных последовательностей, образовавшихся в процессе секвенирования и ПЦР амплификации. Этот этап является самым важным во всем процессе, поскольку наличие неправильных нуклеотидных последовательностей может привести к ошибочному HLA-типированию.

На рисунке 11 представлена диаграмма, показывающая основные этапы биоинформатического анализа. Сначала все полученные последовательности разбиваются с использованием известных праймеров на группы, соответствующие ампликонам для первого и второго классов (по четыре ампликона для каждого класса, прочитанные в обоих направлениях). Идентичные риды 1 внутри ампликона кластеризуются между собой. Из полученных кластеров ридов 1 строится граф, где каждая вершина представляет собой вариант рида 1, и они соединены между собой если между ними имеется не более одной нуклеотидной замены. На основе этого графа выбираются последовательности, обладающие максимальным количеством прочтений и наибольшим числом ребер. Именно такие последовательности чаще всего точно соответствуют базе HLA аллелей. Чтобы скорректировать ошибки, связанные с более низким чем для рида 1 качеством прочтения, для соответствующих ридов 2 строится консенсус. Последней стадией этого этапа является сборка ампликона из рида 1 и рида 2, причем в месте их перекрытия используются нуклеотидные последовательности, прочитанные со стороны рида 1, как более качественного.

На втором этапе анализа полученные последовательности всех 8 ампликонов для первого и второго классов картируются независимо на полную базу аллелей HLA. В качестве правильного аллеля выбирается тот, который безошибочно совпадает с максимальным числом ампликонов. Конечной стадией работы алгоритма является составление HLA-генотипа донора путем комбинирования информации о разных HLA локусах. Описанный подход реализован в виде автоматизированного биоинформатического алгоритма на языке программирования R и доступен по ссылке <https://github.com/asya-minervina/HLA>.

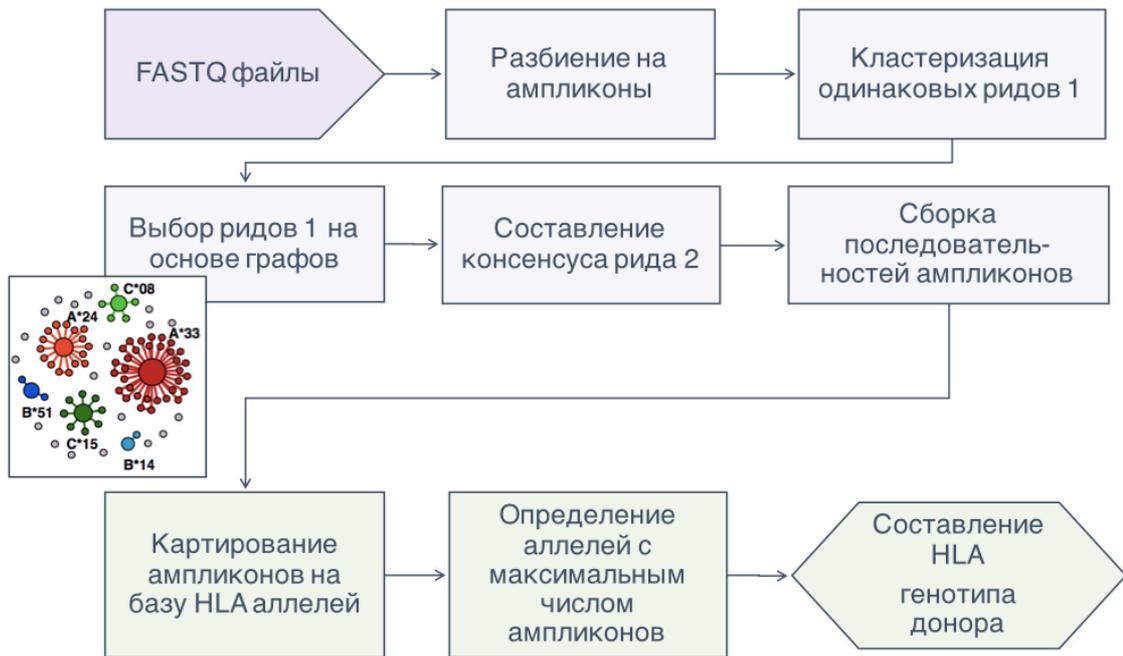


Рис. 11. Этапы автоматизированного биоинформатического алгоритма для анализа данных секвенирования, полученных с помощью описанной системы пробоподготовки, для определения HLA-генотипов доноров.

Разработанная система обладает высокой устойчивостью к возможной потере ампликонов, связанной с плохим качеством РНК. Кроме того, метод не требует большой глубины секвенирования (требуется около 50 000 ридов на образец) и обеспечивает типирование до 3 знака в большинстве образцов. Всего в ходе выполнения работы данным методом было протипировано около 300 доноров, включая доноров, вакцинированных от желтой лихорадки (Таблица 2).

Таблица 2. HLA генотипы доноров M1 и P30.

Ген / Донор	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DRB1	HLA-DRB3/4	HLA-DQB
M1	A*02:01:01/ A*24:02:01	B*15:01:01/ B*39:01:01	C*03:04:01/ C*12:03:01	DRB1*03:01:01/ DRB1*04:01:01	DRB3*02:02:01/ DRB4*01:03:01	DQB1*02:01:01/ DQB1*03:02:01
P30	A*02:01:01/ A*31:01:02	B*35:01:01/ B*48:01:01	C*04:01:01 / C*08:01:01	DRB1*11:01:01/ DRB1*12:01:01	DRB3*01:01:02/ DRB3*02:02:01	DQB1*03:01:01

4.2. Мониторинг Т-клеточного иммунного ответа на первичную и вторичную вакцинацию от желтой лихорадки

4.2.1. Создание коллекции образцов и секвенирование библиотек кДНК TCR

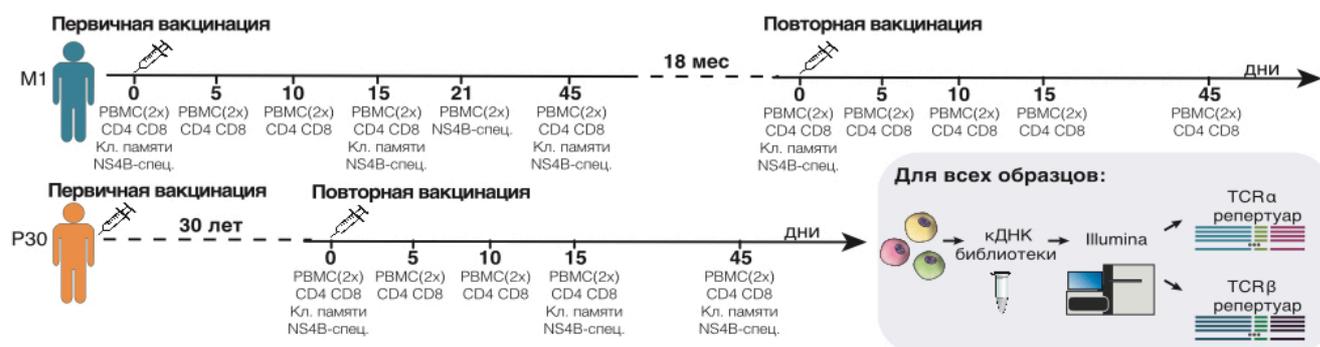


Рис. 12. Общая схема эксперимента. Кровь от доноров М1 и Р30 была получена в различных временных точках до и после первичной и вторичных вакцинаций против вируса желтой лихорадки. Две биологические реплики фракции мононуклеаров периферической крови (PBMC) и различные субпопуляции клеток были получены во всех временных точках. Из полученных клеток была выделена РНК и приготовлены кДНК библиотеки α и β -цепей TCR. Библиотеки были отсеквенированы на платформе Illumina с последующей реконструкцией TCR α и TCR β репертуаров с помощью специализированного программного обеспечения.

Для изучения Т-клеточного иммунного ответа на вакцинацию от желтой лихорадки была собрана коллекция образцов периферической крови двух здоровых доноров (Рисунок 12). Донор Р30 (мужчина, 39 лет) был впервые вакцинирован от ЖЛ более 30 лет назад после чего не пребывал в зонах распространения вируса. Донор М1 (мужчина, 27 лет) ранее не прививался от ЖЛ и в ходе эксперимента был вакцинирован дважды с перерывом в 18 месяцев. Образцы венозной крови были получены в различных временных точках до (день 0) и после первичной и вторичных вакцинаций (дни 5, 10, 15, 21 и 45). В каждой временной точке были получены по две биологические реплики тотальной фракции мононуклеаров периферической крови (PBMC) и выделенные на магнитных частицах фракции CD4 и CD8 Т-лимфоцитов. В отдельных точках дополнительные порции крови были использованы для получения фракций Т-клеток памяти и CD8 клеток, специфичных к иммунодоминантному эпитопу NS4B₂₁₄₋₂₂₂ вируса ЖЛ. Из всех полученных образцов была выделена РНК и с помощью оригинальной системы пробоподготовки [Pogorelyu и др., 2017] получены библиотеки TCR α и TCR β репертуаров.

Кроме того, были секвенированы 3500 единичных клеток, специфичных к NS4B₂₁₄₋₂₂₂ эпитопу вируса ЖЛ через 18 месяцев после иммунизации донора M1. С помощью технологии 10x Genomics для этих клеток были получены парные $\alpha\beta$ TCR репертуары и транскриптомы.

После первичной обработки результатов секвенирования получали реконструированный репертуар TCR, представленный в виде таблиц («клонсетов»), где каждая строка представляет собой клонотип – уникальную нуклеотидную последовательность CDR3. Для каждого клонотипа в таблице указаны: его нуклеотидная и аминокислотная последовательность CDR3, V- D- и J-сегменты, участвовавшие в формировании последовательности, количество уникальных молекулярных идентификаторов (UMI) и доля, занимаемая клонотипом в репертуаре. Все данные секвенирования были выложены в базу данных Short Read Archive (SRA), идентификатор PRJNA577794. Данные о количестве ридов секвенирования, числе UMI и количестве уникальных клонотипов для каждой библиотеки представлены в Приложении 2.

4.2.2. Динамика ответа на первичную и вторичную вакцинацию

Ранее было показано, что первичная вакцинация против ЖЛ приводит к сильной клональной экспансии CD4 и CD8 клеток, специфичных к вирусу [Akondy и др., 2009; Blom и др., 2013; James и др., 2013; Kohler и др., 2012; Miller и др., 2008]. Для того, чтобы выявить такие клоны Т-клеток в секвенированных репертуарах TCR была использована программа *edgeR*, которая обычно используется для выявления дифференциально-экспрессированных генов в транскриптомах [Robinson, McCarthy, Smyth, 2010]. С помощью двух независимых реплик программа определяет уровень шума и затем использует полученную модель для выявления генов, значимо отличающихся по уровню экспрессии. В нашем эксперименте был использован такой же подход для определения клонов значимо ($p < 0.05$ после коррекции на множественное тестирование) и сильно (> 32 раз) увеличивших свою концентрацию между любыми двумя временными точками до пика ответа (дни 0, 5, 10 и 15).

В репертуарах TCR после первичной вакцинации донора M1 с помощью описанного выше подхода было выявлено 1566 TCR α и 1580 TCR β ЖЛ-реактивных клонотипов, которые на пике ответа (день 15) занимают соответственно 7.8% и 6.7% всего репертуара (Рисунок 13). Интересно, что в независимо проанализированных репертуарах α и β -цепей TCR количество изменившихся клонов и их общая доля в репертуаре очень похожи. Для простоты в ходе дальнейшего анализа динамики и силы ответа на вакцинацию будут использованы репертуары β -цепей TCR. В соответствии с ранее опубликованными работами [Akondy и др., 2009; Blom и др., 2013; Kongsgaard и др., 2017; Miller и др., 2008; Pogorelyu и др., 2018b] первичный Т-клеточный ответ на вакцинацию против ЖЛ характеризуется сильной клональной экспансией

общая доля ЖЛ-реактивных клонов возрастает >1000 раз) с пиком ответа примерно через 2 недели после вакцинации. К дню 45 доля ЖЛ-реактивных клонов в репертуаре существенно падает. Мы проследили за поведением полученных ЖЛ-реактивных клонов после вторичной вакцинации через 18 месяцев после первичной. В ходе иммунного ответа на повторную иммунизацию доля ЖЛ-реактивных клонов в репертуаре возрастает всего в 2.5 раза, достигая 0.5% всего репертуара, причем пик ответа приходится на день 10. Таким образом, было показано, что вторичный иммунный ответ на вирус ЖЛ гораздо слабее, но быстрее первичного. Ранее другая группа на большой когорте доноров также показала, что количество активированных и мультимер-специфических клеток после вторичной вакцинации против ЖЛ растет незначительно, и на пике не превышает 1% от всех Т-клеток [Kongsgaard и др., 2017]. Однако, в этой работе впервые были описаны особенности динамики вторичного иммунного ответа на вакцинацию от ЖЛ.

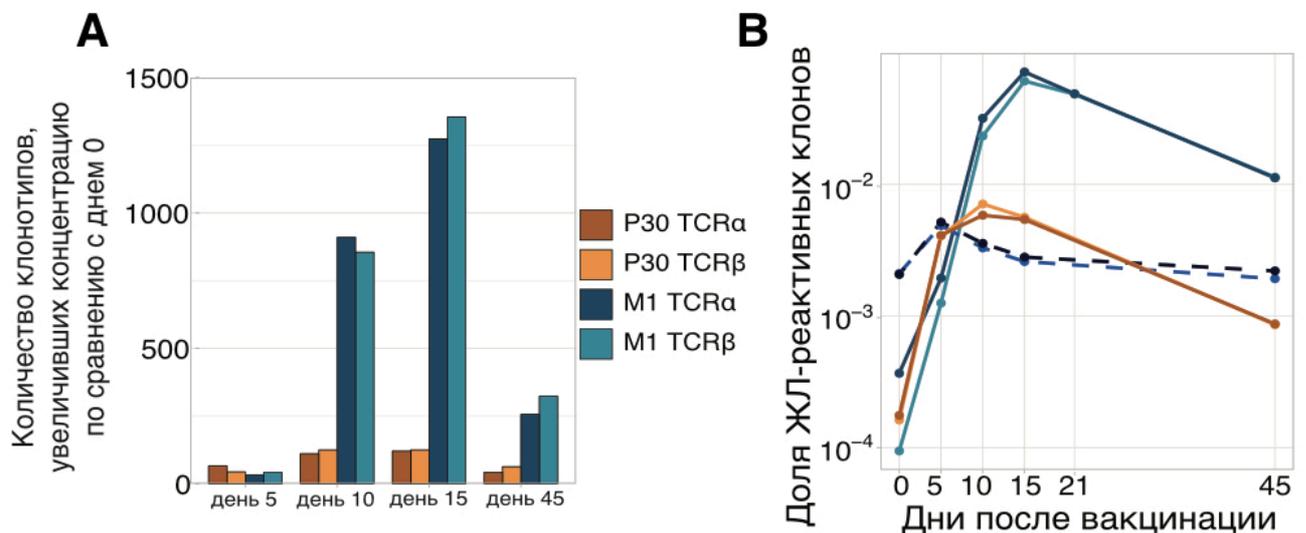


Рис. 13. **А.** Количество α и β TCR клонотипов в различных временных точках после вакцинации от желтой лихорадки, значимо увеличивших свою концентрацию по сравнению с точкой до вакцинации, для доноров M1 и P30. **В.** Доля репертуара (в логарифмическом масштабе), занимаемая ЖЛ-реактивными TCR α и β клонотипами, в различных временных точках до и после первичной (сплошные голубая и синяя линии) и вторичной вакцинации донора M1 (пунктирные голубая и синяя линии) и после вторичной иммунизации донора P30 (желтая и оранжевая линии).

4.2.3. Ответ CD4 и CD8 клонов на вакцинацию от желтой лихорадки

Нуклеотидная последовательность CDR3 каждого клона может быть использована как его уникальный идентификатор, который позволяет сопоставлять репертуары отдельных фракций клеток и тотальный репертуар TCR. Для определения CD4/CD8 фенотипа ЖЛ-

реактивных клонов вычисляли в каком двух репертуаров клонотип присутствует в большей концентрации. Использование такого подхода позволяет, сохраняя точные количественные характеристики для клонов, полученные из репертуаров тотальной фракции РВМС, добавить информацию о фенотипе. Оказалось, что в ответ на вторичную вакцинацию донора М1 CD4 ЖЛ-реактивные клоны отвечают быстрее и сильнее, чем CD8 (Рисунок 14). Общая доля CD4 ЖЛ-реактивных клонов возрастает в 8 раз и достигает максимума уже на день 5, в то время как CD8 клетки увеличивают свою численность всего в 1.5 раза и достигают пика на день 10. Разница в динамике CD4 и CD8 ответа во время первичной иммунизации не настолько заметна, поскольку максимум для обеих субпопуляций приходится на день 15. Однако, в то время как количество ЖЛ-реактивных CD8 клонов упала незначительно ко дню 21, численность CD4 ЖЛ-реактивных клонов к этому времени сократилась более чем в 2 раза. Таким образом, было показано, что CD4 иммунный ответ на вакцину от ЖЛ развивается быстрее, чем CD8, что соответствует результатам, полученным в более ранних работах [Blom и др., 2013].

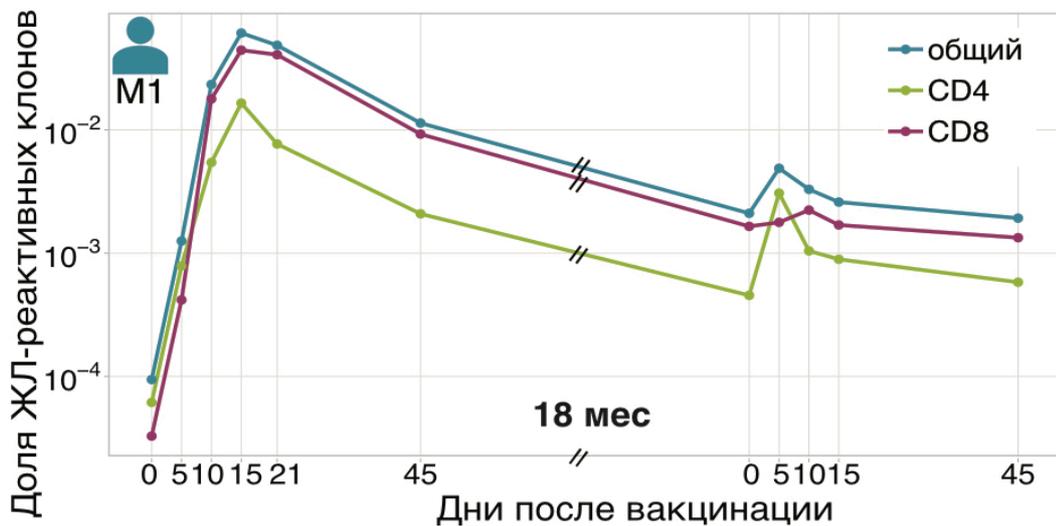


Рис. 14. Доля репертуара (в логарифмическом масштабе), занимаемая ЖЛ-реактивными CD4 и CD8 TCR β клонотипами, в различных временных точках до и после первичной и вторичной вакцинации донора М1.

Интересно, что помимо разницы в динамике CD4 и CD8 ответа на повторную вакцинацию, сила ответа также существенно отличается. Скорее всего это связано с особенностями узнавания антигена CD4 и CD8 клетками. Во время вторичного ответа на вакцину в организме уже присутствуют антитела, которые успешно связывают вирусные частицы, мешая им проникать в клетки. Поскольку CD4 клетки распознают антиген в составе молекулы МНС II класса на которой презентуются пептиды, полученные из внеклеточной среды, CD4 ответ может быть активирован антиген-презентирующими клетками (АПК), которые фагоцитировали связанный антителами вирус. В то время как для успешной активации

CD8 ответа необходима продуктивная вирусная инфекция.

4.2.4. Вторичная вакцинация от желтой лихорадки через 30 лет после первичной

Один из главных аспектов успешной противовирусной вакцинации это формирование Т-клеток памяти. Для того чтобы оценить насколько долго такие клетки памяти могут сохраняться, мы нашли донора (P30), который был впервые вакцинирован от желтой лихорадки 30 лет назад, и проследили за изменениями в его TCR репертуаре после повторной вакцинации. Поскольку в данном случае последовательности TCR клонов, ответивших на первичную вакцинацию неизвестны, ЖЛ-реактивные клоны были определены с помощью *edgeR*, также как для первичной вакцинации донора M1. Было обнаружено 201 TCR α и 204 TCR β ЖЛ-реактивных клонотипа для этого донора, что значительно ниже, чем для доноров, вакцинированных впервые (Рисунок 15). Эти ЖЛ-реактивные клоны возрастают в 25 раз уже к дню 5 и достигают пика (0.69% доля ЖЛ-реактивных клонов в репертуаре) на день 10 после вторичной вакцинации через 30 лет после первичной (Рисунок 13). Таким образом, наблюдаемый у донора P30 иммунный ответ на вторичную иммунизацию обладает сходной динамикой и силой со вторичным ответом донора M1. Это свидетельствует в пользу того, что у донора P30 в течении 30 лет сохранились клетки памяти, образовавшиеся после первичной иммунизации против ЖЛ.

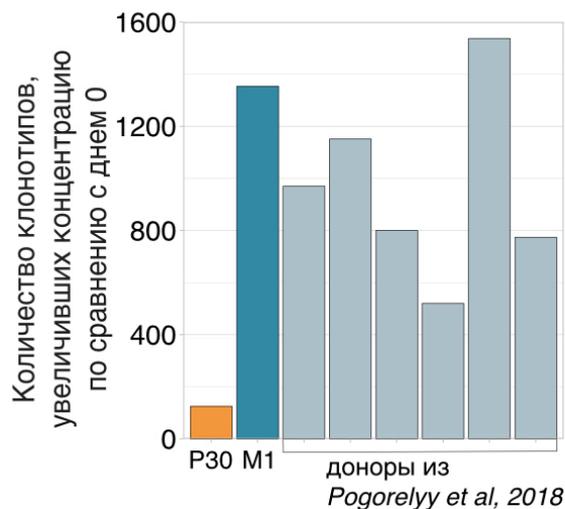


Рис. 15. Количество клонотипов, значимо увеличивших свою концентрацию между днем 0 и днем 15 после вакцинации от ЖЛ, для доноров P30, M1 и шести доноров из [Pogorelyu и др., 2018b]. Доноры из [Pogorelyu и др., 2018b] и M1 были вакцинированы от ЖЛ впервые. Донор P30 получил повторную вакцинацию через 30 лет после первичной.

Концентрации ЖЛ-реактивных клонов как у донора М1 перед первичной вакцинацией, так и у донора Р30 перед повторной иммунизацией были очень малы (Рисунок 13). Количество CD8 клеток специфичных к иммунодоминантному пептиду NS4B₂₁₄₋₂₂₂ вируса ЖЛ, определенное при помощи FACS до начала вакцинации у доноров также не различалось (Рисунок 16). Таким образом, не было обнаружено значимых различий в количестве ЖЛ-реактивных клеток невакцинированного донора и донора, вакцинированного 30 лет назад. Это может быть связано с тем, что исследовались только TCR периферической крови доноров, в то время как Т-клетки памяти могут находиться в других тканях.

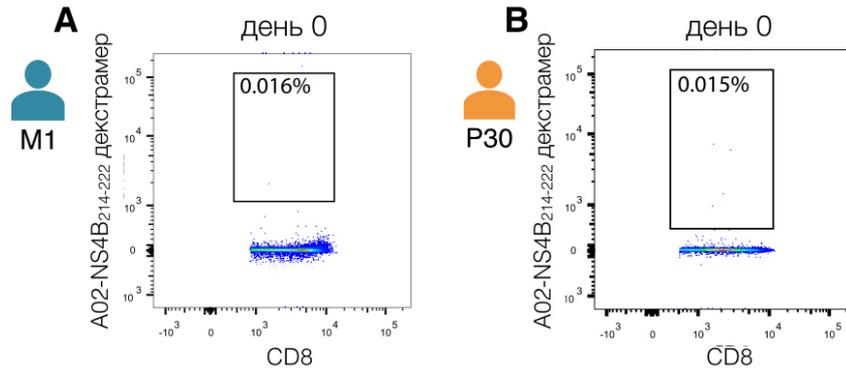


Рис. 16. Количество NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфических CD8 T-клеток в день 0 для наивного донора М1 (А) и донора, впервые вакцинированного от вируса ЖЛ 30 лет назад (В). Проценты показывают долю NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфических T-клеток от всех CD3+CD8+ клеток.

4.2.5. Индивидуальная динамика ЖЛ-реактивных клонотипов

Секвенирование репертуара Т-клеток позволяет не только проследить общую динамику ответа на вакцинацию, но и оценить вклад каждого конкретного ЖЛ-реактивного клона в иммунный ответ. На рисунке 17 показаны индивидуальные клональные траектории (т.е. доли отдельных клонов в репертуаре каждой временной точки) для всех ЖЛ-реактивных клонов доноров М1 и Р30.

Несмотря на то, что общий вторичный ответ на иммунизацию гораздо слабее первичного, ряд клонов реагирует очень сильно на повторную вакцинацию, причем это характерно как для вакцинации через 18 месяцев, так и для вакцинации через 30 лет. Кроме того, для вторичного иммунного ответа характерно большее количество клонов, достигающих пика ответа на дни 5 и 10, в то время как в ходе первичного иммунного ответа большинство ЖЛ-реактивных клонов достигает пика на дни 15 и даже 21. Таким образом, было показано, что во время вторичного иммунного ответа на вакцину от ЖЛ происходит быстрая и сильная пролиферация ЖЛ-специфических Т-клеток.

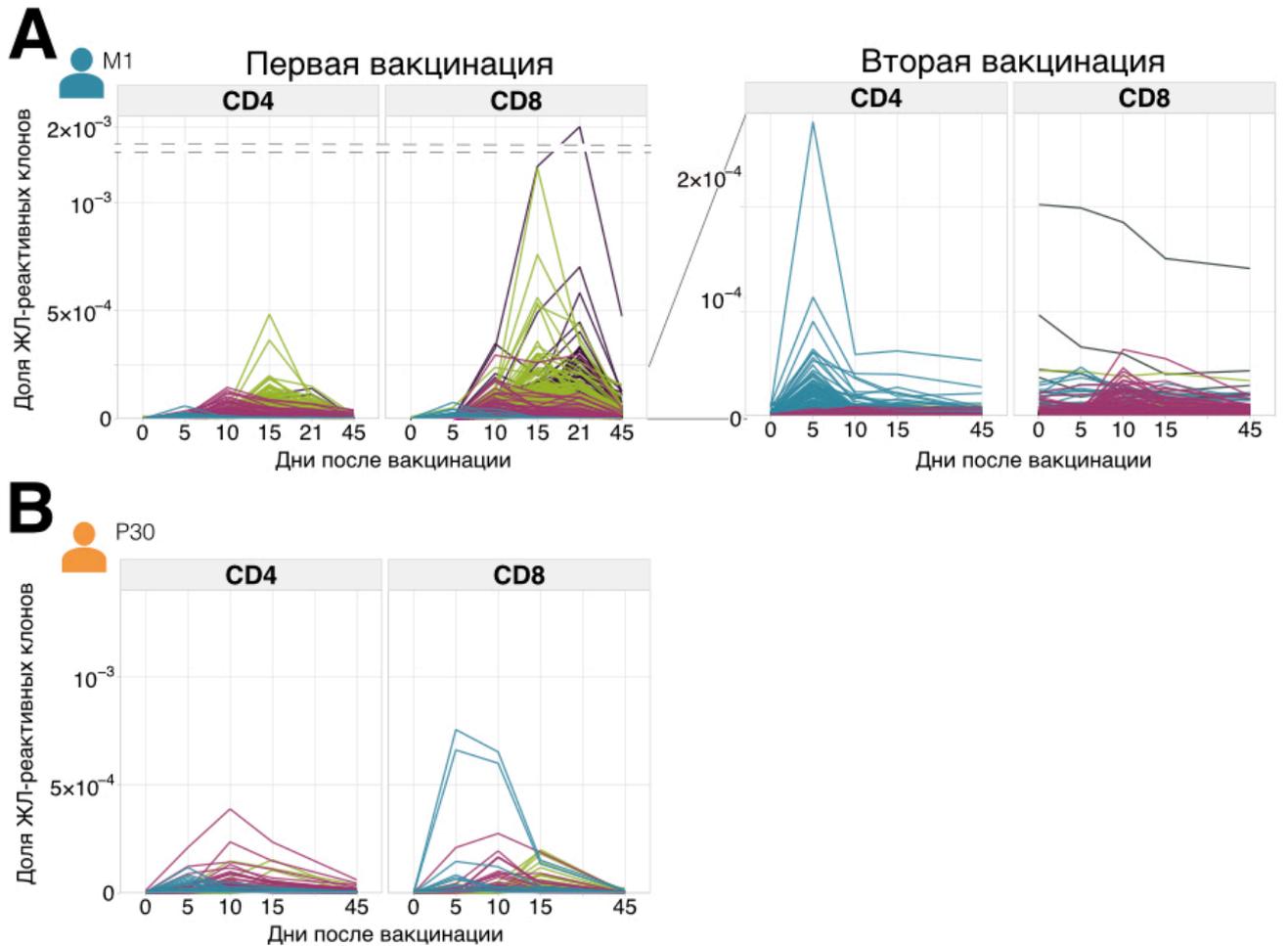


Рис. 17. Индивидуальные клональные траектории для всех ЖЛ-реактивных клонов доноров M1 и P30. Показана доля репертуара, занимаемая каждым ЖЛ-реактивным клоном, в различных точках после вакцинации от вируса желтой лихорадки. Индивидуальные клоны значительно увеличивают свою концентрацию после первичной (A, слева) и вторичных вакцинаций от ЖЛ как через 18 месяцев (A, справа), так и через 30 лет (B) после первичных. Кривые клональных траекторий окрашены в разные цвета в соответствии с днем, когда концентрация клонотипа достигает максимума. Голубые кривые соответствуют клонотипам с пиком на день 5, розовые – с пиком на день 10, зеленые – с пиком на день 15, а фиолетовые – с пиком на день 21.

Интересно, что сила экспансии отдельных клонов отличается во много раз. Это может служить косвенным аргументом в пользу гипотезы о программируемой пролиферации Т-клеток после взаимодействия с антигеном [Моогге и др., 2019]. В отличие от антиген-зависимой гипотезы пролиферации, предполагающей необходимость контакта с антигеном для каждого деления, гипотеза программируемой пролиферации говорит о том, что единственного контакта Т-клетки с антигеном достаточно для инициации нескольких последовательных делений этой клетки. При этом для разных антиген-специфических клеток количество делений будет

варьироваться в некоторых пределах. Поскольку существует степенная зависимость между количеством делений и общим количеством Т-клеток, процесс программируемой пролиферации как раз и приведет к наблюдаемой гетерогенности клональных траекторий.

4.2.6. Слежение за индивидуальными клонотипами после первичной вакцинации

Последовательные вакцинации донора M1 предоставили уникальную возможность проследить за судьбой всех ЖЛ-реактивных клонов, ответивших на первую иммунизацию, в ходе вторичного иммунного ответа. Оказалось, что концентрации для ЖЛ-реактивных клонов после первой вакцинации (на день 45) и через 18 месяцев (день 0 перед второй вакцинацией) хорошо коррелируют (Рисунок 18, коэффициент корреляции Пирсона, $r=0.46$, $p<0.0001$). Следовательно, можно предположить, что все ЖЛ-реактивные клоны умирают с одинаковой скоростью и временем полужизни около 158 дней. Ранее с помощью окрашивания эффекторных ЖЛ-специфических Т-клеток дейтерием была получена очень похожая оценка времени полужизни равная 123 дням [Akondy и др., 2017]. Интересно, что если экстраполировать эти оценки на более длительный срок, то окажется, что уже через 12 лет в организме не останется ни одной ЖЛ-специфической Т-клетки. Но как следует из нашего и других исследований иммунная защита от вируса ЖЛ может сохраняться 30 и возможно даже более лет. Это означает, что либо скорость умирания Т-лимфоцитов на самом деле не постоянна и замедляется со временем, либо существует отдельная долгоживущая популяция Т-клеток памяти не подчиняющаяся этому закону. В пользу последнего свидетельствует ряд исследований о Т-клетках памяти «наивного» фенотипа T_{scm} , которые, в отличие от других субпопуляций клеток памяти, не умирают, а сохраняются на постоянном уровне у людей, вакцинированных против ЖЛ [Akondy и др., 2017; Fuertes Marraco и др., 2015].

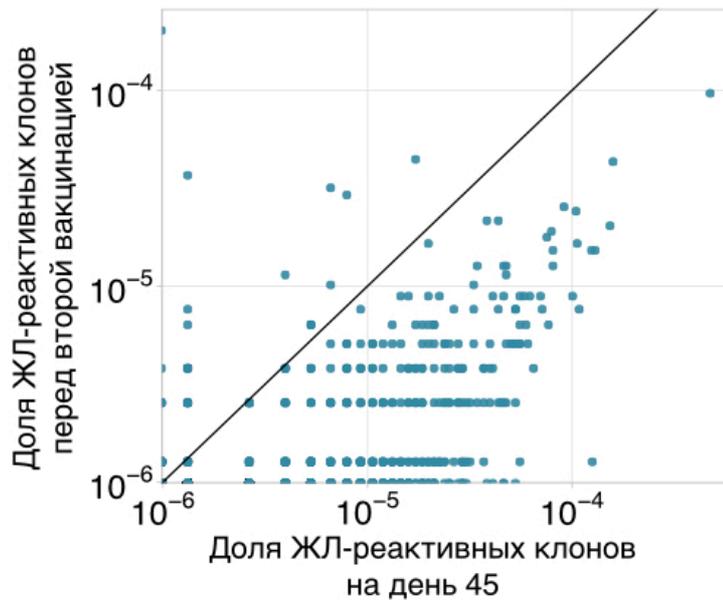


Рис. 18. Уменьшение концентраций ЖЛ-реактивных клонов между первичной и вторичной иммунизацией донора М1. Концентрация ЖЛ-реактивных клонов на день 45 после первичной вакцинации (ось x) отложена против концентрации этих клонов на день 0 перед вторичной иммунизацией (ось y) в логарифмическом масштабе. Концентрации в этих двух точках хорошо коррелируют, коэффициент корреляции Пирсона, $r=0.46$, $p<0.0001$. Сплошная диагональная линия показывает $x=y$.

Ранее в работе [DeWitt и др., 2015] было показано, что лишь 5–6% ЖЛ-реактивных клонов переходит в иммунную память после вакцинации. Аналогичный анализ, проведенный на полученных нами данных показал, что около 96% CD4 и 88% CD8 ЖЛ-реактивных клонов можно обнаружить хотя бы в одной временной точке после повторной иммунизации. Вероятно, это связано с недостаточной глубиной секвенирования TCR репертуаров в предыдущем исследовании. Если увеличить величину забираемых образцов крови и глубину секвенирования, скорее всего можно было бы повторно обнаружить все ЖЛ-реактивные клоны из первой иммунизации. Таким образом, было показано, что практически все разнообразие ЖЛ-реактивных клонов сохраняется в виде иммунной памяти через 1.5 года после первичной иммунизации.

Интересно, что при реактивации Т-клеток памяти на вторую иммунизацию через 1.5 года после первой оказалось, что CD8 клоны сохранившие более высокую численность не размножаются в ответ на повторную вакцинацию, а CD8 клоны с маленькой численностью увеличивают свою концентрацию (Рисунок 19). В то же время практически все CD4 ЖЛ-реактивные клоны отвечают на вторичную иммунизацию независимо от их доли в репертуаре. Причины такой зависимости силы ответа на ревакцинацию ЖЛ-реактивных CD8 клонов от доли, занимаемой в репертуаре требуют дальнейшего исследования.

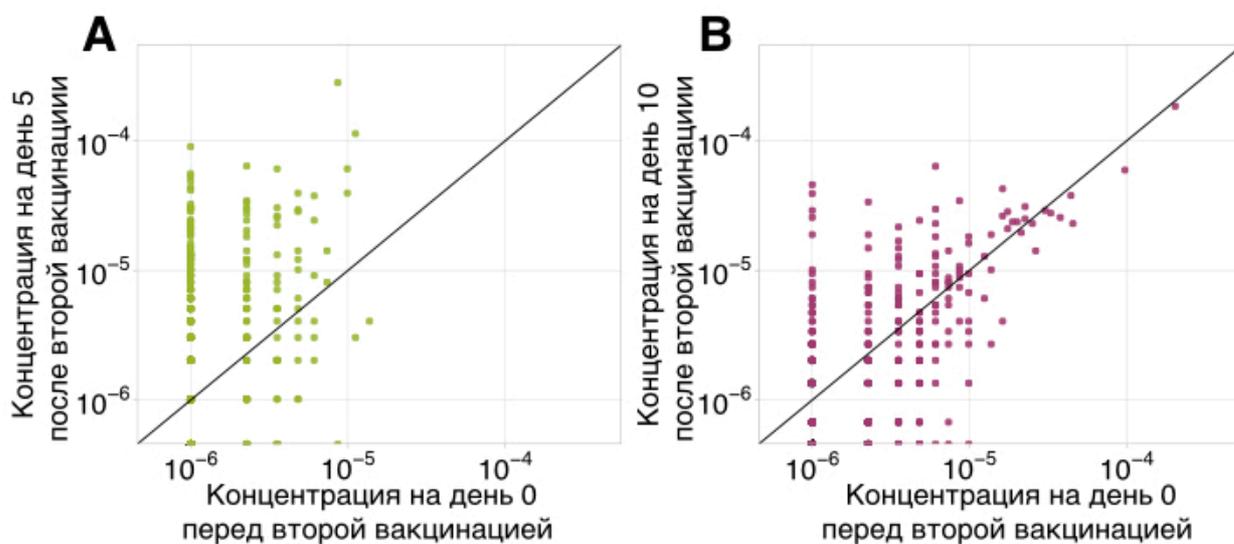


Рис. 19. Концентрации *CD4* (A) и *CD8* (B) ЖЛ-реактивных клонов в общем TCR репертуаре в точке до вторичной иммунизации донора M1 (ось x) и на пике иммунного ответа на вторичную вакцинацию (ось y). Диагональная линия показывает $x=y$.

4.2.7. Идентификация изменившихся клонов на основе индивидуальных клональных траекторий

Анализ индивидуальных клональных траекторий ЖЛ-реактивных клонов показал, что все они обладают активной динамикой, в то время как концентрации большинства других клонов в репертуаре довольно стабильны. Чтобы это визуализировать был использован метод главных компонент (PCA).

Из TCR репертура донора M1, а также шести доноров из предыдущего исследования [Pogorelyu и др., 2018b] были выбраны 1000 клонов, наиболее представленных на день 15. Для этих клонов была получена матрица, где каждый ряд – это клон, а каждая колонка – доля клона в репертуаре во временных точках до и после иммунизации. Другими словами, для каждого клона мы получили его клональную траекторию. Затем каждая клональная траектория была нормализована на максимальную концентрацию для каждого клона. Интересно, что при применении PCA к полученным матрицам и дальнейшей визуализации результатов клоны Т-клеток разделяются на два четких кластера (Рисунок 20А, В). Один из кластеров соответствует клонам, идентифицированным как ЖЛ-реактивные при помощи *edgeR*, а другой остальным клонам в репертуаре. Набор клонов, определенных как ЖЛ-реактивные с помощью иерархического классификатора на нормализованных клональных траекториях, имеют динамику схожую с набором клонов, выявленных с помощью *edgeR* (Рисунок 20С).

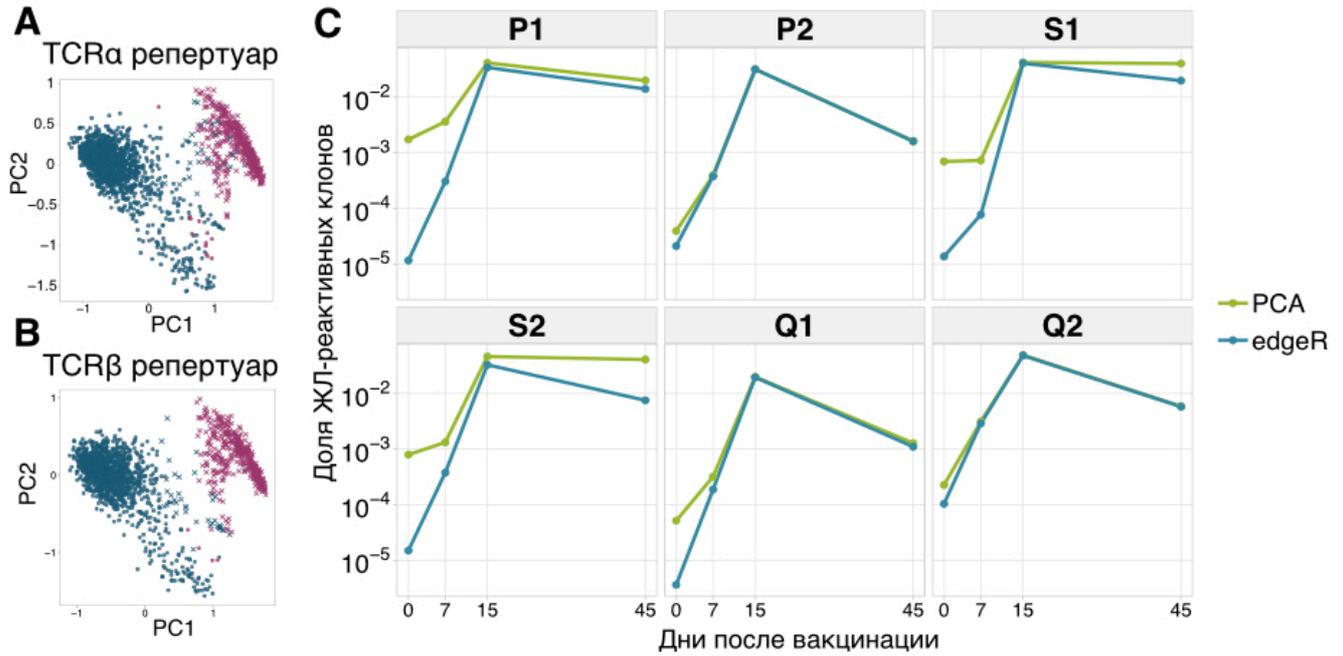


Рис. 20. А. В. Проекция индивидуальных клональных траекторий на первые две главные компоненты для 1000 самых представленных α (А) и β (В) клонов донора М1 на день 15 после вакцинации от вируса желтой лихорадки. Перед применением метода главных компонент все концентрации были нормализованы на максимальную концентрацию для каждого клонотипа. Розовые точки соответствуют ЖЛ-реактивным клонотипам, идентифицированным с помощью edgeR. Круги и кресты показывают два кластера найденных при помощи иерархического метода кластеризации. С. Динамика Т-клеточного иммунного ответа на первичную вакцинацию от вируса желтой лихорадки (данные из [Pogorelyu и др., 2018b]). Общая доля репертуара, занимаемая ЖЛ-реактивными клонами, найденными edgeR, в разных временных точках после вакцинации показана голубым цветом. Зеленая кривая показывает долю репертуара, занимаемую клонами, идентифицированными с помощью иерархического метода кластеризации на клональных траекториях.

Новый метод выявления отвечающих клонов не требует наличия биологических реплик и каких-либо исходных знаний о времени пика иммунного ответа. Применение такого метода анализа к репертуарам иммунных клеток полученным в последовательных временных точках, может помочь выявить группы клонов, реагирующих на различные стимулы.

4.2.8. Спаривание α и β -цепей TCR на основе клональных траекторий

Визуализация клональных траекторий с помощью PCA показала удивительно схожие результаты для α и β репертуаров TCR. Исходя из этого решили проверить можно ли использовать клональные траектории для определения парных $\alpha\beta$ TCR. Принцип такого подхода

проиллюстрирован на рисунке 21.

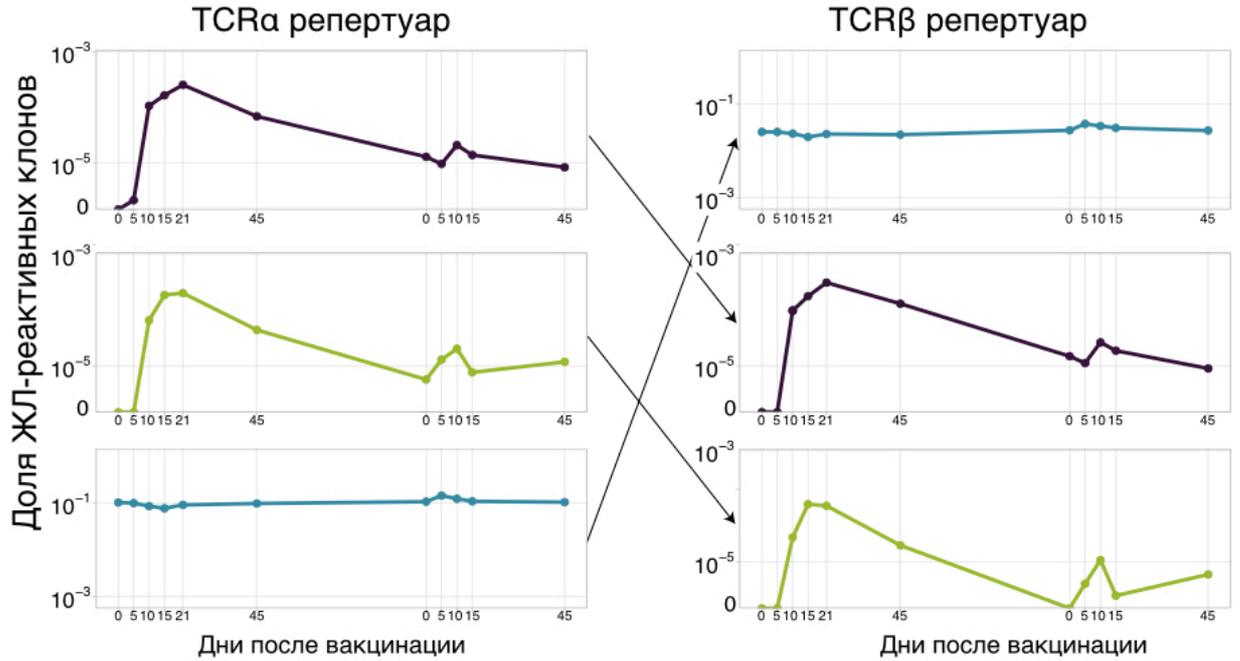


Рис. 21. Примеры индивидуальных клональных траекторий для α (слева) и β -цепей (справа) TCR для двух ЖЛ-реактивных клонов (фиолетовая и зеленая кривая) и одного клона, не отвечающего на вакцинацию (голубая кривая). Схожесть в форме клональных траекторий двух цепей одного TCR делает возможным спаривание цепей *in silico*.

Для реализации этого подхода была придумана мера расстояния между клональными траекториями, которая учитывает шум при определении концентраций клонов и возможную разницу в экспрессии между α и β -цепями TCR.

В качестве меры расстояния было использовано Эвклидово расстояние между трансформированными клональными траекториями:

$$D(C_\alpha, C_\beta) = \sqrt{\sum_i (t(C_{\alpha,i}) - t(C_{\beta,i}))^2},$$

где $C_{\alpha,i}$ и $C_{\beta,i}$ – это концентрации α и β TCR в i -ой временной точке.

Трансформация t для концентраций клонотипов C учитывает овердисперсию в определении частоты клонотипа при больших концентрациях [Pogorelyu и др., 2018b]:

$$t(C_i) = \log_{10} (\sqrt{a + bC_i} + \sqrt{bC_i}),$$

где $a=4.26 \cdot 10^{-6}$ и $b=3.09 \cdot 10^{-3}$.

Чтобы учесть возможную разницу в экспрессии α и β -цепей TCR в одном клонотипе был введен коэффициент сдвига клональных траекторий λ с квадратичным штрафом ($\mu=0.1$):

$$D_s(C_\alpha, C_\beta) = \min_\lambda (D(C_\alpha, 10^\lambda C_\beta) + \mu\lambda^2).$$

Для спаривания цепей были выбраны 1000 наиболее представленных клонотипов из α и β TCR репертуаров донора M1 на день 15 и посчитано расстояние D_s для всех возможных пар α и β клонотипов. Для каждого TCR α клонотипа было получено 5 наиболее близких (с наименьшим D_s) β -цепей. Чтобы проверить результаты такого теоретического спаривания были получены парные $\alpha\beta$ TCR репертуары для CD3+ фракции клеток и Т-клеток специфичных к иммунодоминантному пептиду вируса ЖЛ (NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичные) с помощью технологии 10x Genomics. Эти две фракции клеток существенно различаются по своей динамике. Тотальная фракция CD3+ клеток содержит самые высокопредставленные клоны в репертуаре, которые не меняют своей концентрации в ходе вакцинации против ЖЛ, в то время как NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичные Т-клетки активно размножаются и умирают. С помощью разработанного подхода удалось получить правильные пары как для клонов с активной динамикой, так и для высокочисленных стабильных TCR в репертуаре. Из 62 NS4B-специфических клонов полученных в 10x эксперименте, с помощью клональных траекторий были верно определены пары $\alpha\beta$ TCR для 41 клона. 20 из 26 клонов были верно спарены для тотальной CD3+ фракции.

4.2.9. Изменение клеточного фенотипа в ходе вакцинации от желтой лихорадки

После иммунизации от вируса ЖЛ образуются долгоживущие клетки памяти, которые удается обнаружить в крови на протяжении многих лет после вакцинации [Akondy и др., 2009; Fuertes Marraco и др., 2015; James и др., 2013; Kongsgaard и др., 2017; Wieten и др., 2016]. Было показано, что эти клетки памяти образуются уже в активной фазе противовирусного ответа, предположительно непосредственно из эффекторных клеток [Akondy и др., 2017].

Чтобы проследить за формированием иммунной памяти были отсекуены TCR репертуары основных субпопуляций клеток памяти: центральная память CM (CD45RA–CCR7+), эффекторная память EM (CD45RA–CCR7–) и терминально-дифференцированная эффекторная память EMRA (CD45RA+CCR7–) на дни 0, 15, 45 и 18 месяцев после первичной вакцинации донора M1 и на дни 0, 15 и 45 после вторичной вакцинации донора P30. Дополнительно в точках день 0 и 45 была собрана фракция «наивной» Т-клеточной памяти Tscm (CD45RA+CCR7+CD95+). Стратегия выделения всех субпопуляций с помощью FACS показана на рисунке 22.

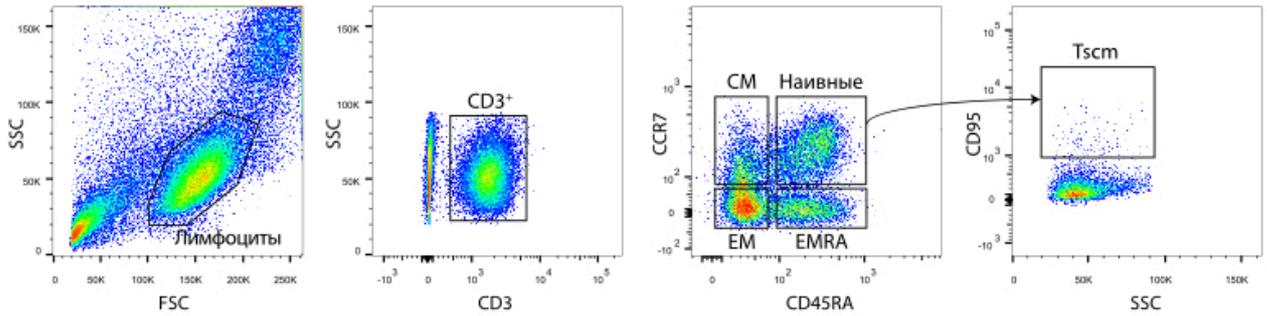


Рис. 22. Стратегия разделения субпопуляций клеток памяти на диаграммах плотности при флуоресцентном сортировке. Были выделены следующие субпопуляции: Т-клетки центральной памяти (СМ) $CD3+CCR7+CD45RA-$, Т-клетки эффекторной памяти (ЕМ) $CD3+CCR7-CD45RA-$, терминально-дифференцированные Т-клетки памяти (ЕМРА) $CD3+CCR7-CD45RA+$, клетки «наивной» памяти (Тscm) $CD3+CCR7+CD45RA+CD95+$.

До вакцинации (на день 0) у обоих доноров концентрация ЖЛ-реактивных клонов в тотальном репертуаре была слишком незначительной, чтобы повторно идентифицировать их в какой-либо сортированной субпопуляции Т-клеток памяти. С другой стороны, практически все ЖЛ-реактивные клоны были обнаружены в одной или нескольких субпопуляциях клеток памяти на дни 15 и 45 после вакцинации. Оказалось, что распределение как ЖЛ-реактивных, так и остальных клонов между субпопуляциями памяти связано с их CD4/CD8 фенотипом (Рисунок 23А). В соответствии с другими исследованиями [Sathaliyawala и др., 2013; Thome и др., 2014], CD4 клоны периферической крови представлены в ЕМ и СМ, в то время как CD8 клоны имеют ЕМ или ЕМРА фенотип. Интересно, что большинство CD8 клонов в репертуаре имеют стабильный фенотип между днями 15 и 45 (Рисунок 23В), а ЖЛ-реактивные клоны переходят из ЕМ субпопуляции в ЕМРА (Рисунок 23С). Такой переход объясняется двумя параллельными процессами: постепенным умиранием ЕМ клеток и непосредственно изменением фенотипа клеток, в частности реэкспрессией маркера CD45RA. Через 18 месяцев после первичной вакцинации донора М1 практически все CD8 ЖЛ-реактивные клоны имели ЕМРА фенотип. Таким образом, было показано, что секвенирование TCR может быть использовано для слежения за изменениями фенотипа отдельных клонов.

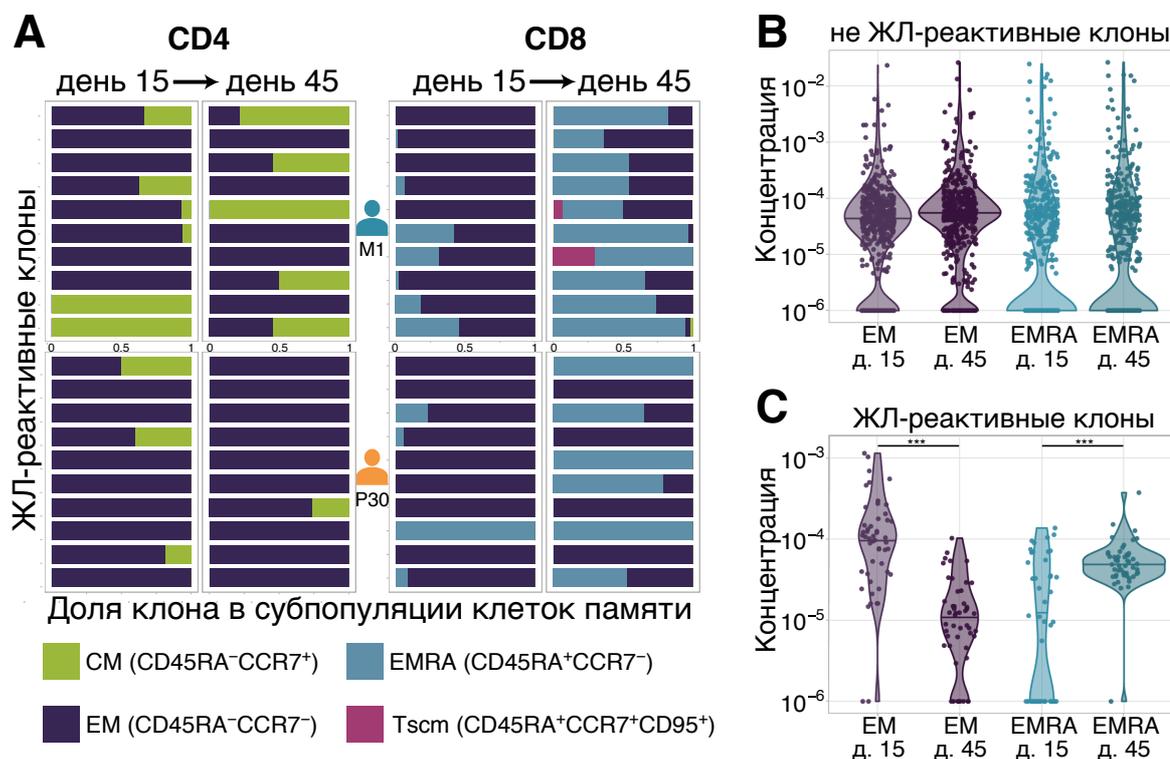


Рис. 23. Распределение клонотипов между фенотипами T-клеток памяти. **А.** Каждый столбик соответствует ЖЛ-реактивному клону, где цветом показана доля этого клона в каждой из четырех фенотипов клеток памяти для доноров M1 (сверху) и P30 (снизу) на дни 15 и 45 после вакцинации от ЖЛ. Каждая панель показывает 10 самых представленных CD4 (слева) и CD8 (справа) клонов на день 45 после вакцинации. **В. С.** Концентрация CD8 клонов с определенным фенотипом в тотальном репертуаре на 15 и 45 день после вакцинации: для клонов, не отвечающих на вакцинацию (**В**), и ЖЛ-реактивных клонов (**С**) (U-критерий Манна-Уитни EM: $p=2.2 \cdot 10^{-12}$, EMRA: $p=1.2 \cdot 10^{-6}$). Для анализа были использованы только клоны с более чем 30 UMI в тотальном репертуаре PBMC.

4.2.10. Сила иммунного ответа на иммунодоминантный эпитоп вируса желтой лихорадки

В составе белка NS4B вируса ЖЛ есть иммунодоминантный эпитоп LLWNGPMAV (позиции в белке 214-222 а.о.), вызывающий сильный CD8 иммунный ответ у всех HLA-A02 позитивных доноров [Akondy и др., 2009; Blom и др., 2013; Kongsgaard и др., 2017; Wieten и др., 2016]. С использованием HLA-A02-мультимера с этим пептидом была получена фракция NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных клеток для доноров M1 и P30 в различных временных точках до и после вакцинации (Рисунок 24).

Эти клетки были использованы для секвенирования α и β репертуаров TCR. Всего было получено около 2100 α и около 2000 β -цепей TCR специфичных к иммунодоминантному

эпитопу вируса ЖЛ. На данный момент — это самый большой набор последовательностей TCR, специфичных к эпитопу ЖЛ.

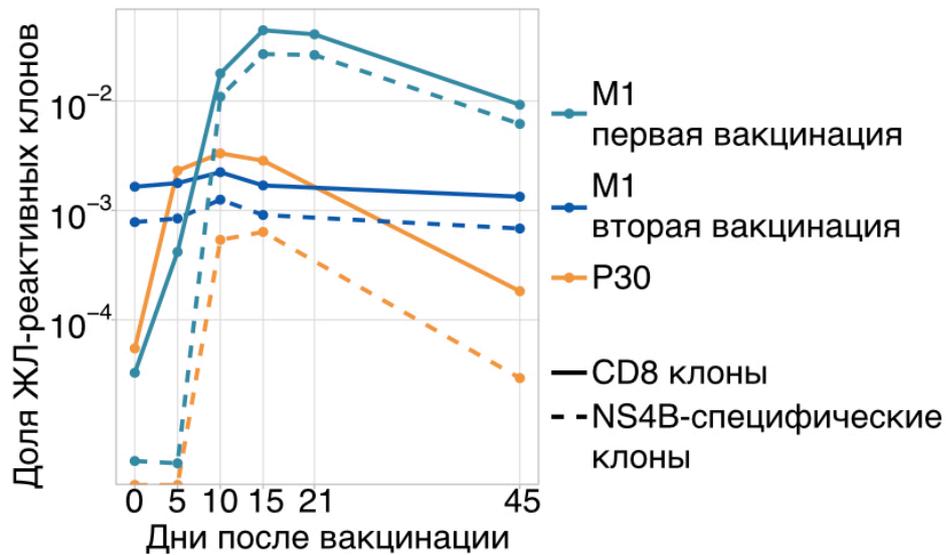


Рис. 24. Доля репертуара (в логарифмическом масштабе), занимаемая ЖЛ-реактивными CD8 (сплошные линии) и NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфическими TCR β клонотипами (пунктирные линии), в различных временных точках до и после вакцинации доноров M1 и P30.

На рисунке 24 представлена динамика всего CD8 ответа и специфического NS4B₂₁₄₋₂₂₂ CD8 ответа после первичной и вторичной иммунизации доноров M1 и P30. Интересно, что по результатам FACS (Рисунок 25) количество NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфических клеток достигает максимума на день 21, в то время как пик ответа по результатам секвенирования репертуаров приходится на день 15. Такие же отличия по динамике присутствуют и в работах других исследователей [Akondy и др., 2009; Kongsgaard и др., 2017], где пик ответа по окрашиванию МНС-мультимером отстает на неделю от пика, наблюдаемого при окраске Т-клеток на маркеры активации, однако эти различия не обсуждаются. Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что активированные клетки по какой-то причине плохо окрашиваются МНС-мультимерами. Так, показано, что на пике активации Т-клетки могут снижать количество экспрессируемого корцептора CD8, что в свою очередь может снизить аффинность к МНС-мультимеру [Rius и др., 2018; Xiao, Mescher, Jameson, 2007].

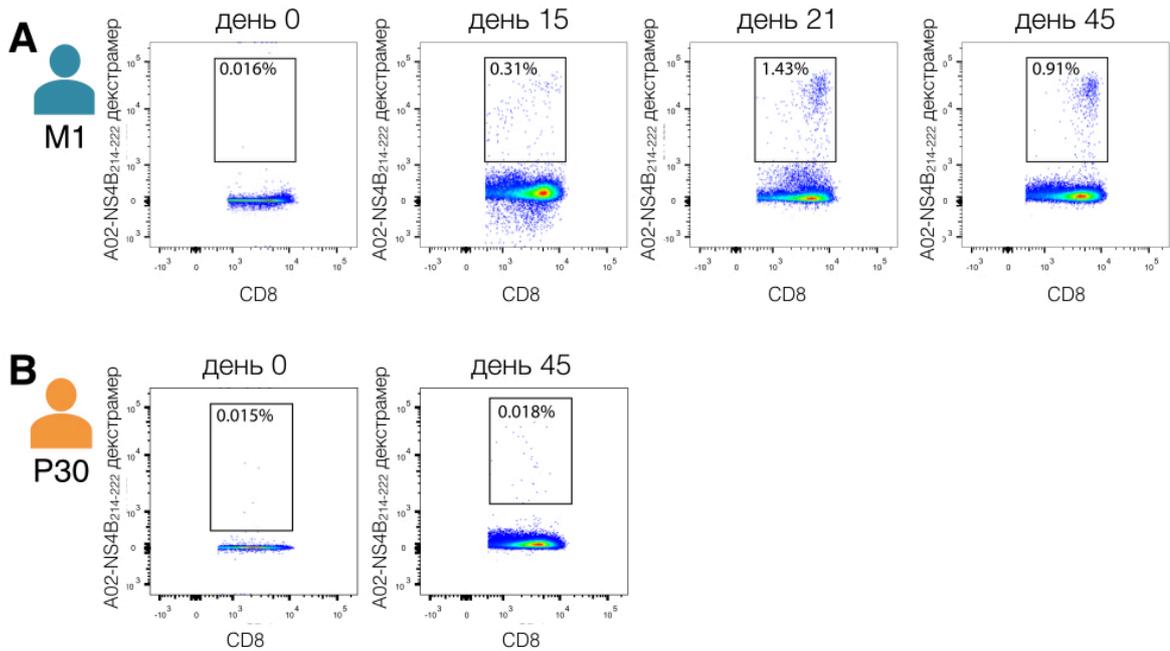


Рис. 25. Количество NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфических T-клеток у доноров M1 (A) и P30 (B) в различных временных точках после вакцинации от желтой лихорадки. Проценты показывают долю NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфических T-клеток от всех CD3+CD8+ клеток.

Имея нуклеотидные последовательности TCR, специфичные к NS4B₂₁₄₋₂₂₂, и нуклеотидные последовательности всех клонов, реагирующих на вакцинацию от ЖЛ (получены с помощью *edgeR*) можно оценить долю иммунодоминантного иммунного ответа. Более 30% NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных TCR клонотипов были независимо обнаружены с помощью *edgeR*, что доказывает эффективность разработанного подхода к идентификации антиген-специфичных TCR на основе клональной экспансии. Оказалось, что у донора M1 более 60% всего цитотоксического иммунного ответа направлено против данного эпитопа. Ранее такой сильный фокус цитотоксического клеточного иммунного ответа *in vivo* на конкретных эпитопах был показан при гриппозной инфекции у мышей [Thomas и др., 2006].

Полученные результаты о вкладе единственного эпитопа на T-клеточный иммунный ответ поднимают вопрос о возможной роли HLA-генотипа людей в ответе на различные инфекции. Остается неясным величина и состав иммунного ответа HLA-A02-негативных доноров, иммунная система которых не может презентировать NS4B₂₁₄₋₂₂₂ иммунодоминантный эпитоп. Удивительно, но все исследованные нами доноры, вакцинированные от ЖЛ имеют HLA-A02, другое же исследование [DeWitt и др., 2015] вообще не содержит информации о HLA-генотипах. Интересным продолжением настоящей работы было бы исследование T-клеточного репертуара доноров с различными HLA в ответ на вакцинацию от вируса ЖЛ для выявления принципиально различных доминантных мотивов иммунного ответа и оценки зависимости силы ответа от наличия иммунодоминантных эпитопов.

4.2.11. Анализ характеристических аминокислотных последовательностей TCR, специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса желтой лихорадки

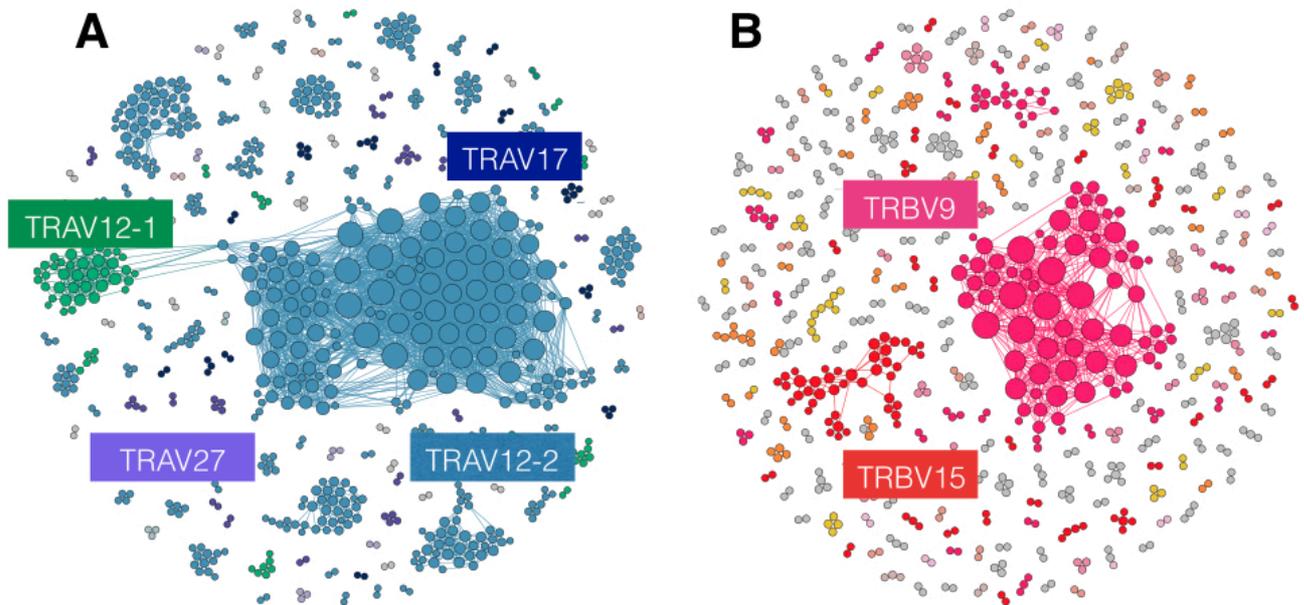


Рис. 26. Графы TCR α (A) и β репертуаров (B) NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфических клеток. Каждая вершина представляет собой клонотип. Они соединяются между собой, если клонотипы отличаются не более чем на одну аминокислотную замену. Размер вершины соответствует ее степени (количеству смежных ребер). Изолированные вершины (не имеющие ребер) не показаны. Цветом показаны V-сегменты, частота использования которых в NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфических клонах значимо выше, чем в тотальном репертуаре (точный тест Фишера, $p < 0.001$ после коррекции методом Бенджамини–Хохберга).

Чтобы понять есть ли какие-то особенности TCR репертуара клонов, специфичных к NS4B₂₁₄₋₂₂₂, которые могли бы объяснить иммунодоминантность этого пептида, мы решили посмотреть на аминокислотные последовательности CDR3 α и β -цепей TCR. Для визуализации разнообразия TCR удобно использовать графы, где каждая вершина соответствует аминокислотной последовательности CDR3 клонотипа. Вершины на графе соединены если они отличаются на не более чем на одну аминокислотную замену. Такие графы для TCR α и TCR β репертуаров NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных клонов представлены на рисунке 26.

TCR репертуар NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных клонов характеризуется неравномерным использованием TRAV и TRBV сегментов, а также превалированием CDR3 с определенной длиной. Так для CDR3 α NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных TCR характерна длина 10 аминокислот, а

CDR3 β длина 13 и 14 аминокислот (Рисунок 27А, В). V-сегменты TRAV12-1, TRAV12-2, TRAV27 и TRAV17 используются в NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных клонах чаще, чем для других клонов в репертуаре (точный тест Фишера, $p < 0.001$ после коррекции методом Бенджамини–Хохберга). Причем 45% клонов использует TRAV12-2, что в 10 раз чаще, чем в остальном репертуаре. Интересно, что почти все TRAV12-2 TCR NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных Т-клеток имеют CDR3 длиной 10 аминокислот. Для TCR β репертуара NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных клеток характерны сегменты TRBV9, TRBV15 и TRBV6-1/2. Почти 37% всех клонов используют TRBJ2-7. Таким образом, проведенный анализ аминокислотных последовательностей CDR3 клонов специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса ЖЛ показал наличие кластеров похожих клонов в репертуарах как α , так и β -цепей TCR. Самые большие кластеры в α и β репертуарах характеризуются использованием V-сегментов TRAV12-2 и TRBV9 (Рисунок 26). Мотивы для CDR3 двух основных кластеров специфичных к NS4B₂₁₄₋₂₂₂ TCR представлены на рисунке 27С, D. Ранее были описаны публичные NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичные TCR α , соответствующие обнаруженному нами мотиву [Bovay и др., 2018], мотив в TCR β для NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных клонов описан впервые в настоящей работе.

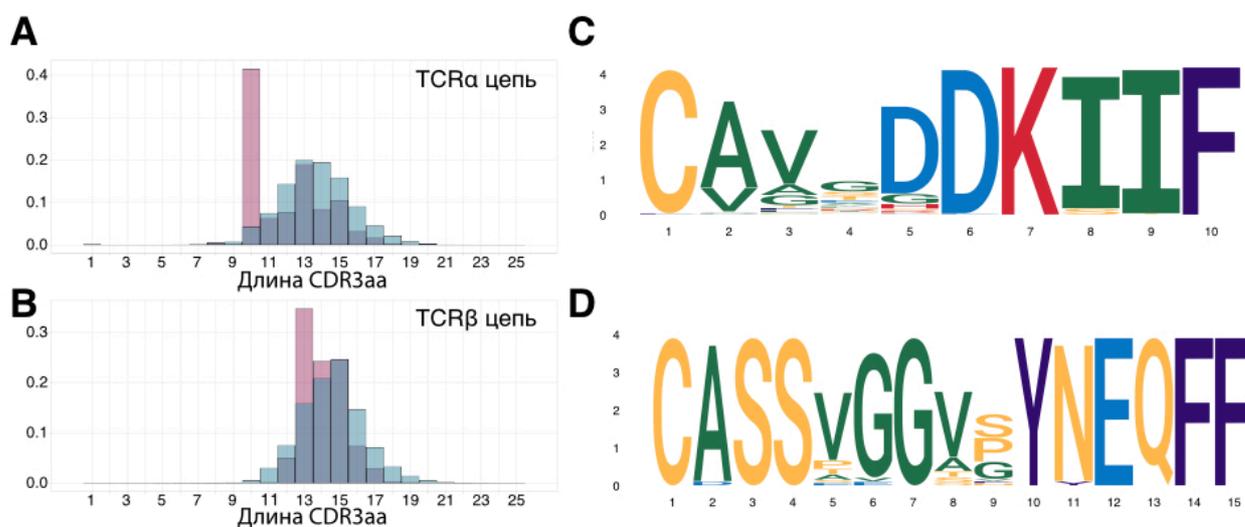


Рис. 27. Распределение длин аминокислотных CDR3 α (A) и β (B) в тотальном TCR репертуаре (голубой) и в репертуаре NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфических Т-клеток (розовый). Мотивы в аминокислотной последовательности CDR3 α (C) и CDR3 β (D) для самых больших кластеров похожих TCR в репертуарах NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных клеток.

4.2.12. Анализ парного $\alpha\beta$ TCR репертуара клонов, специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса желтой лихорадки

Для того чтобы понять, как описанные кластеры похожих клонов в α и β репертуарах

TCR NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных клонх соотносятся между собой, была использована технология 10x Genomics для получения парных репертуаров $\alpha\beta$ TCR. Было секвенировано 3500 единичных клеток, специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса ЖЛ. Из этих данных было выделено 164 парных $\alpha\beta$ TCR. Граф на рисунке 28А показывает не только сходство внутри аминокислотных последовательностей CDR3 α (голубые) и β (розовые), но и то, как они спарены в $\alpha\beta$ TCR (линии соединяющие вершины разного цвета). Оказалось, что большой кластер похожих TCR α , характеризующийся использованием TRAV12-2, спарен с разными непохожими β -цепями (решение 1), но не с кластером похожих по последовательностям β -цепей, использующих TRBV9 (решение 2).

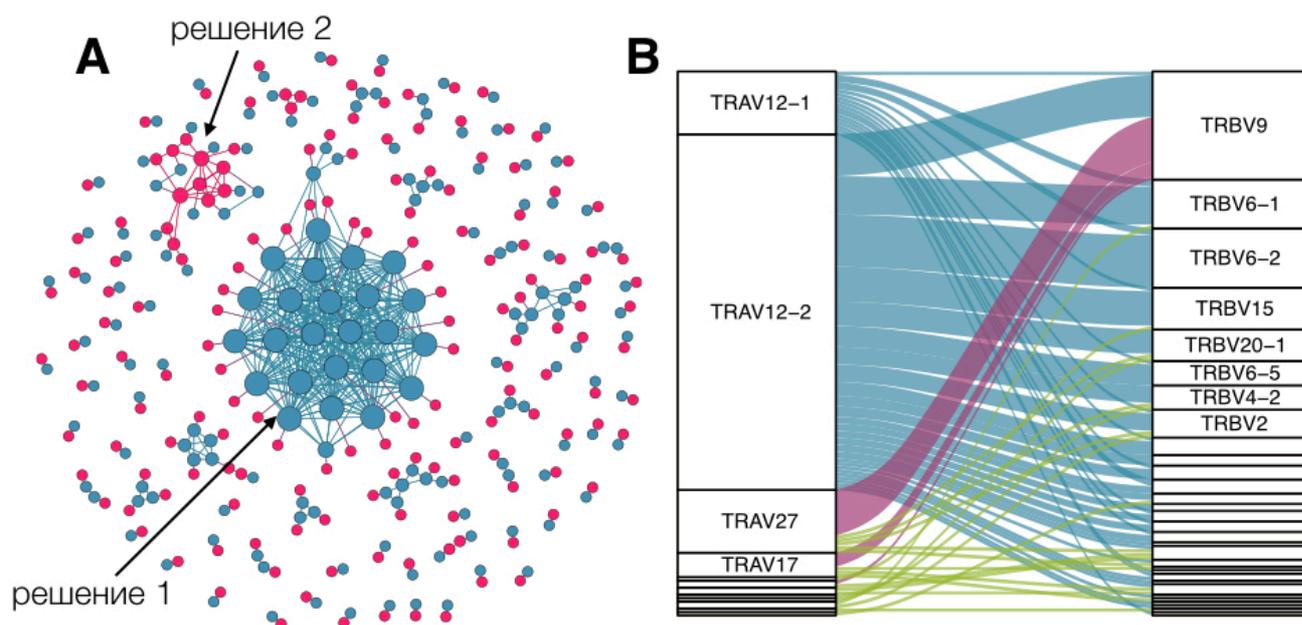


Рис. 28. Структура $\alpha\beta$ TCR репертуаров NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных клонов. **А.** Граф, показывающий как сходство внутри цепей одного типа (ребра, соединяющие вершины одного цвета), так и спаривание между двумя цепями (ребра, соединяющие вершины разного цвета). Каждая вершина соответствует TCR α (голубые) или TCR β (розовые) клонотипу. Стрелками указаны кластеры, соответствующие ранее обнаруженным самым большим кластерам α и β репертуаров (см. рисунок 26). **В.** Диаграмма потока показывающая обнаруженные спаривания между TRAV и TRBV сегментами в парном $\alpha\beta$ TCR. Голубые линии соответствуют структурному решению 1, розовые линии соответствуют структурному решению 2.

Чтобы более формально описать эти наблюдения, необходимо выбрать признак кластера. В качестве этого признака было решено использовать V сегменты α и β -цепей, поскольку они хорошо характеризуют отдельные группы похожих CDR3 (Рисунок 26). Таким образом, для описания спаривания между α и β -цепями использовали спаривание TRAV и TRBV сегментов. Оказалось, что для большинства NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных TCR такое

спаривание не отличается от случайного (Рисунок 29). Однако TCR использующие TRBV9 предпочитают иметь в паре TRAV27 вместо TRAV12-2.

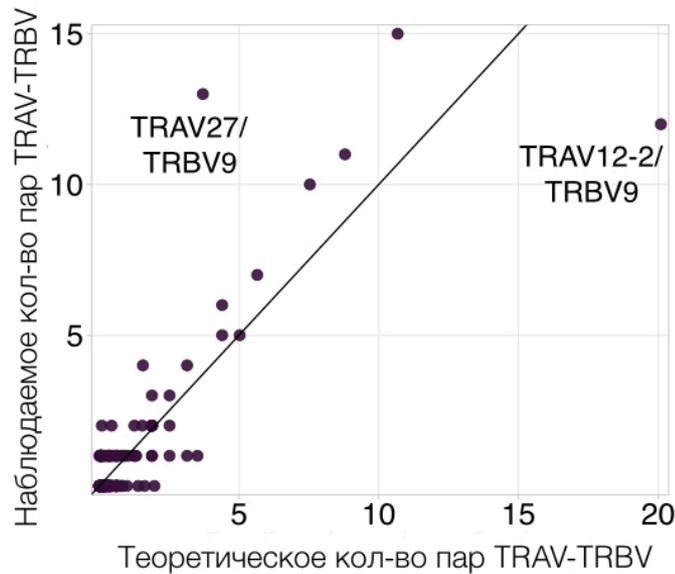


Рис. 29. Спаривание TRAV-TRBV в NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных клонах. Каждая точка на графике соответствует комбинации V-сегментов α и β -цепи TCR. Наблюдаемое количество пар между TRAV-TRBV в парных TCR (ось y) отложено против теоретического количества таких пар, при условии, что спаривание между сегментами происходит случайно (ось x). Диагональ показывает $x=y$. Сегмент TRBV9 образует больше пар с TRAV27 и меньше пар с TRAV12-2, чем ожидается при случайном спаривании сегментов.

Другой способ визуализации в виде диаграммы потока представлен на рисунке 28B. Видно, что TCR с TRAV12-1 и TRAV12-2 спариваются с большим количеством разнообразных TRBV сегментов, в то время как TRAV27 TCR почти всегда связан с TRBV9. На первый взгляд TRAV12-2 TCR специфичные к NS4B₂₁₄₋₂₂₂ могут спариваться с любыми β -цепями TCR. Действительно TRAV12-2 обнаруживается в паре с β -цепями, использующими все V- и J-сегменты, и подавляющее большинство CDR3 этих β -цепей имеет длину 13 или 14 аминокислот. Таким образом, впервые было описано два разных структурных решения для связывания иммунодоминантного эпитопа вируса ЖЛ (TRAV12-2 с любым TRBV и TRAV27 с TRBV9). Кроме того, существует множество индивидуальных TCR, не похожих между собой, связывающих этот пептид. Другими словами, существует множество конфигураций TCR для решения проблемы распознавания конкретного пептида. Ранее для других пептидов также было показано, что разнообразие связывающих их TCR может быть очень велико [Bagaev и др., 2019; Dash и др., 2017; Glanville и др., 2017; Sandt van de и др., 2019; Song и др., 2017; Zhang и др., 2018].

4.2.13. Структурное моделирование $\alpha\beta$ TCR, специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса желтой лихорадки

Для того чтобы выявить особенности связывания между комплексом pMHC и двумя описанными типами TCR использовали молекулярное моделирование. С помощью программы *Repertoire Builder* [Schritt и др., 2019] были получены структурные модели $\alpha\beta$ TCR для 152 рецепторов. Затем методом молекулярного докинга с использованием *RosettaDock* [Lyskov, Gray, 2008] полученные рецепторы соединялись с известной структурой HLA-A02 с пептидом LLWNGPMAV вируса ЖЛ [Bovay и др., 2018]. Для каждого из рецепторов получали 1000 структур комплекса TCR-pMHC и затем отбирали 30 лучших моделей, имеющих самую большую поверхность связывания. Во время молекулярного докинга возможно образование структур, обладающих неестественными для комплексов TCR-pMHC углами связывания [Pierce, Weng, 2013]. Чтобы исключить из дальнейшего анализа такие структуры, было подсчитано минимальное среднее квадратичное отклонение координат центров масс α и β -цепей TCR модели от всех известных структур в базе данных [Vogtman и др., 2017]. Были использованы только структуры, где это расстояние не превышало 4 ангстрема. Другими словами, полученные модели должны быть похожи по конфигурации хотя бы на одну известную структуру комплекса TCR-pMHC. Для каждого из отобранных рецепторов было посчитано среднее по структурам количество связей между участками CDR рецептора и пептидом, рецепторы были разделены на группы в соответствии с обнаруженными ранее кластерами (Рисунок 30).

Оказалось, что количество связей между CDR1 участком α -цепей TCR, имеющих TRAV12, и иммунодоминантным пептидом вируса ЖЛ значительно выше (U-критерий Манна-Уитни $p=0.00015$), чем для TCR с TRAV27. Поскольку CDR1 участок кодируется непосредственно V-сегментом, а не образуется в процессе V(D)J-рекомбинации подобно CDR3, для такого распознавания эпитопа важным является именно наличие TRAV12 сегмента. Таким образом, в соответствии с более ранними предположениями [Bovay и др., 2018; Zhang и др., 2018] была показана определяющая роль α -цепи TRAV12 для связывания NS4B₂₁₄₋₂₂₂ эпитопа вируса ЖЛ. Интересно, что количество связей между пептидом и CDR3 α участком для этих TCR, значительно ниже (U-критерий Манна-Уитни $p=0.009$), чем для TCR с TRAV27. Это свидетельствует в пользу того, что давление селекции в области CDR3 α рецепторов с TRAV12-2 будет более слабым, чем для рецепторов с TRAV27. Чтобы проверить эту гипотезу с помощью механистической модели сборки [Murugan и др., 2012] были сгенерированы α -цепи TCR длины 10 аминокислот с TRAV12-2 и α -цепи TCR длины 13 аминокислот с TRAV27. Действительно, 9 из 20 самых частых по вероятности сборки TCR α с TRAV12-2 были

обнаружены среди идентифицированных NS4В-специфичных α -цепей, в то время как ни один из 20 самых частых TCR α с TRAV27 обнаружен не был. Таким образом, на структурном уровне было показано наличие двух различных конфигураций TCR, связывающих иммунодоминантный пептид вируса ЖЛ. При этом TRAV27 TCR имеют «классическую» модель связывания, где большая часть контактов между рецептором и пептидом приходится на участки CDR3. В то время как большая часть связей в TRAV12 TCR-pMHC комплексе расположена непосредственно между V-сегментом и пептидом.

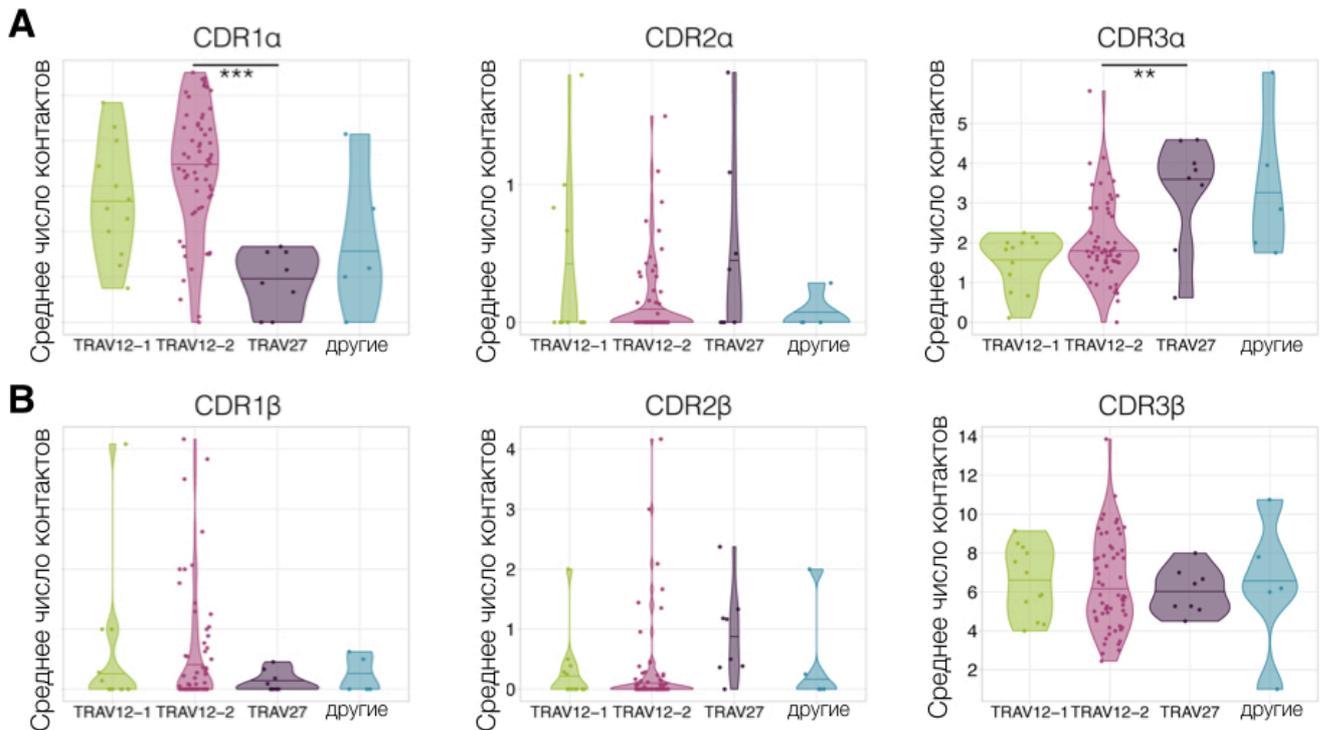


Рис. 30. Среднее количество контактов между пептидом LLWNGPMAV и участками, определяющими комплементарность (CDR1, CDR2 и CDR3) в α (A) и β (B) TCR специфичных к пептиду клонов. TCR с TRAV12 (зеленые и розовые) имеют значительно больше контактов в CDR1 α , чем TCR с TRAV27 (фиолетовые) (U-критерий Манна-Уитни $p=0.00015$). С другой стороны, TCR с TRAV27 имеют больше контактов в области CDR3 α , чем TCR с TRAV12 (U-критерий Манна-Уитни $p=0.009$).

Полученные результаты говорят о том, что для успешного распознавания NS4В₂₁₄₋₂₂₂ пептида TCR достаточно соответствовать сравнительно небольшому ряду условий: иметь TRAV12-2 и CDR3 α длины 10 аминокислот и CDR3 β длины 13–14 аминокислот. Исходя из известных моделей сборки TCR [Murugan и др., 2012] можно утверждать, что такие структурные варианты TCR будут встречаться в индивидуальных TCR репертуарах с повышенной частотой. Другими словами, частота наивных предшественников, связывающих этот эпитоп будет довольно велика. Действительно ряд исследований показал, что даже у

доноров, никогда не вакцинированных против вируса ЖЛ, в крови можно обнаружить достаточно большое количество наивных клеток, связывающих мультимер HLA-A02-NS4B₂₁₄₋₂₂₂ [Afik и др., 2017; Fuertes Marraco и др., 2015; Zhang и др., 2018]. Исходя из этих данных, можно предположить, что именно высокая частота наивных предшественников, которая связана с особенностями распознавания пептида, определяет его иммунодоминантность. Таким образом, можно ожидать, что и другие иммунодоминантные эпитопы будут иметь часто сборные последовательности TCR, определяющие распознавание пептида.

4.2.14. Анализ фенотипического разнообразия NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфических клеток через 1.5 года после вакцинации от желтой лихорадки

Одновременно с секвенированием парных $\alpha\beta$ TCR для единичных NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфических клеток через 1.5 года после вакцинации для этих же клеток была отсекувенирована тотальная мРНК (scRNAseq, single cell RNA sequencing). Использование стандартных поверхностных маркеров CCR7 и CD45RA на FACS показало, что большая часть ЖЛ-специфических клонов через 1,5 года после вакцинации имеет EMRA фенотип. Однако RNAseq отдельных NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфических клеток выявил существенную гетерогенность в экспрессии генов внутри субпопуляции клеток памяти. scRNAseq был выполнен по 5'RACE технологии с использованием эмульсионной платформы 10x Genomics. Для первичной обработки данных секвенирования был использован стандартный протокол в программе *Cell Ranger 2.2.0* (10x Genomics), где полученные последовательности были картированы на референсный геном GRCh38-1.2.0. По окончании этого этапа была получена матрица, где каждый ряд соответствует гену, а столбец молекулярному баркоду, идентифицирующему каждую отдельную клетку. Дальнейший анализ полученной матрицы проводился в среде программирования R с использованием пакета для анализа RNAseq единичных клеток Seurat версии 3.0 [Butler и др., 2018; Stuart и др., 2019]. Важным этапом при анализе таких данных является фильтрация. Так, из матрицы были удалены клетки в которых было обнаружено менее 200 генов. Затем были удалены гены, которые представлены менее чем в трех клетках. Также были удалены гены V, J и C сегментов (TRAV, TRAJ, TRBV, TRBJ и тд), поскольку мРНК этих генов всегда неравномерно представлены в Т-клетках и вносят нежелательную гетерогенность в данные RNAseq отдельных клонов. На рисунке 31 представлены наиболее вариабельные гены до и после фильтрации генов геномных сегментов TCR. Видно, что до фильтрации именно эти гены вносят основной вклад в гетерогенность отдельных клеток, маскируя действительно

интересные особенности дифференциальной экспрессии. Последним этапом фильтрации является удаление мультимеров клеток и мертвых клеток, которые образуются в процессе пробоподготовки, для этого из анализа убираются клетки, имеющие большое количество генов (более 2700) и большой процент митохондриальных генов (более 8%). После фильтрации осталось 3500 отдельных NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных клеток. Затем матрица генной экспрессии была нормализована с использованием стандартного протокола в пакете *Seurat* и 2000 наиболее переменных генов были выбраны для дальнейшего анализа.

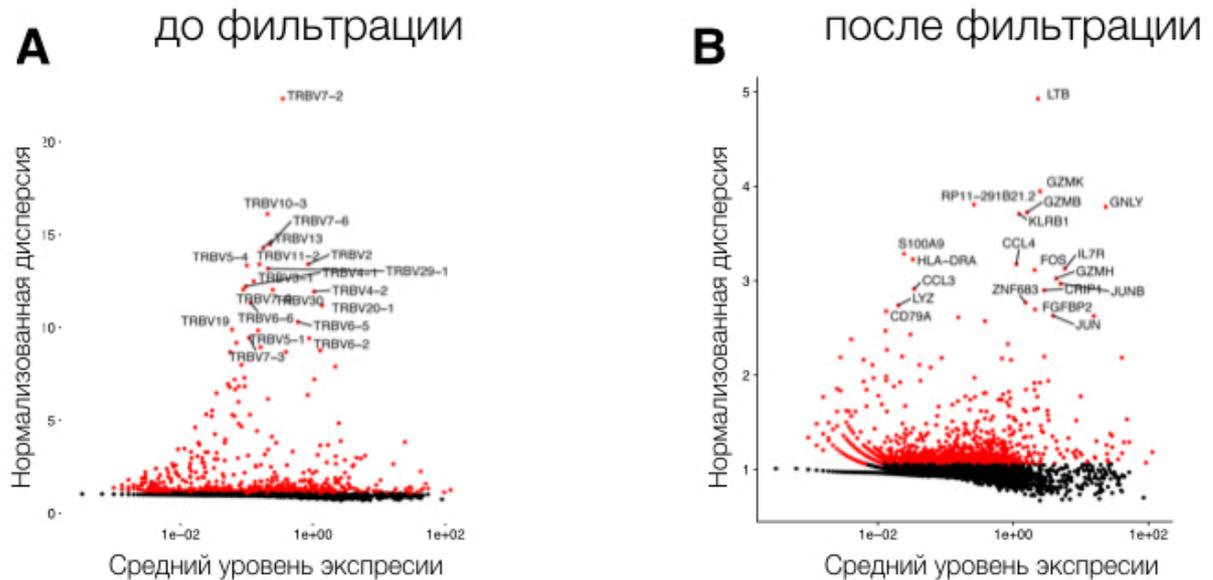


Рис. 31. Наиболее переменные гены в транскриптах отдельных NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных клеток до (A) и после (B) фильтрации генов сегментов TCR.

Результат кластеризации на основе 2000 генов в двумерной проекции представлен на рисунке 32A. С помощью алгоритма кластеризации (параметр гетерогенности кластера был равен 0.4, в соответствии с рекомендациями для данных такого размера) было выявлено три группы клеток с различным паттерном генной экспрессии. Чтобы выявить гены экспрессия которых различается между этими кластерами был использован алгоритм MAST [Finak и др., 2015] (Рисунок 32B). Всего было выявлено 166 дифференциально экспрессированных генов.

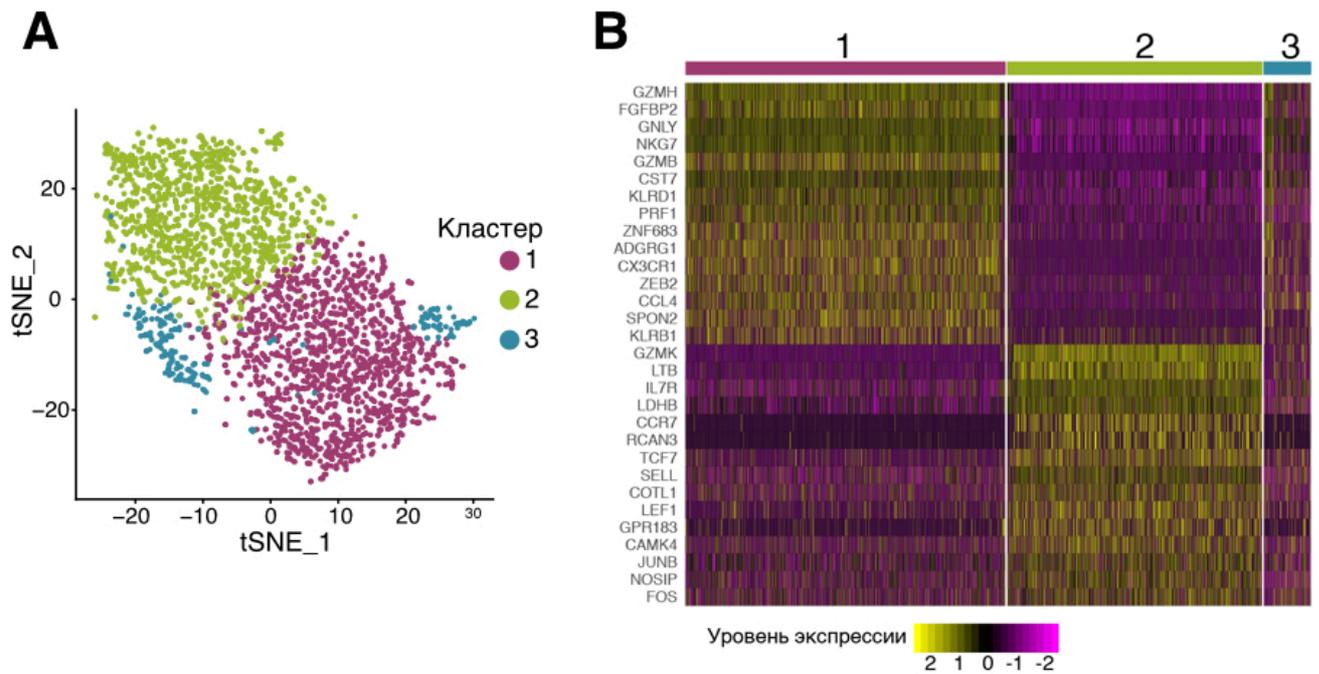


Рис. 32. Фенотипическое разнообразие *NS4B*₂₁₄₋₂₂₂-специфических клеток через 18 месяцев после вакцинации. **А.** Двухмерная визуализация фенотипических кластеров клеток, обнаруженных программой *Seurat* на основании 2000 наиболее вариабельных генов, с помощью *t-SNE* алгоритма.

В. Тепловая карта 15 наиболее характеристических генов для кластеров клеток 1 и 2.

Кластер 1 характеризуется высокой экспрессией генов, связанных с цитотоксичностью: *GZMB*, *GNLY*, *GZMH*, *NKG7*, *PRF1*, *CX3CR1*, *SPON2*, *KLRD1*, а также транскрипционных факторов *Nobit* и *T-bet* (Рисунок 33). Исходя из совокупности генов можно предположить, что цитотоксическая функция этих клеток регулируется через перфориновый путь. Кластер 2 имеет высокую экспрессию таких генов как *CCR7*, *TCF7*, *SELL*, *JUNB*, *LEF1* и *IL7R*, которые являются маркерами долгоживущей памяти и важны для выживания и пролиферации Т-клеток [Jeannet и др., 2010; Jung и др., 2016; Kaech и др., 2003; Schluns и др., 2000; Zhou и др., 2010]. Однако для клеток из кластера 2 также характерна экспрессия таких цитотоксических генов как *GZMK* и *LTB*, а также *KLRG1*, *KLRB1*, *T-bet* и *GZMH*, хотя и на более низком уровне, чем в кластере 1 (Рисунок 34). Если попытаться соотнести полученные кластеры клеток с традиционными субпопуляциями клеток, то окажется что кластер 1 наиболее близок к *EMRA*, а кластер 2 наиболее похож на так называемую «наивную память» *Tscm* [Mold и др., 2019]. Однако современные исследования транскриптома и протеома единичных клеток показывают, что деление на традиционные субпопуляции клеток может быть достаточно далеко от реальности, где каждая популяция будет состоять из клеток существенно отличающихся по генной экспрессии. Так клетки, называемые *EMRA* и *Tscm* судя по всему существенно отличаются на

уровне отдельных клеток по генной экспрессии и представляют собой собирательные названия для нескольких мало изученных субпопуляций клеток. Так, описанные в этой работе кластеры клеток были ранее описаны для CD4 цитотоксических лимфоцитов EMRA популяции памяти [Patil и др., 2018].

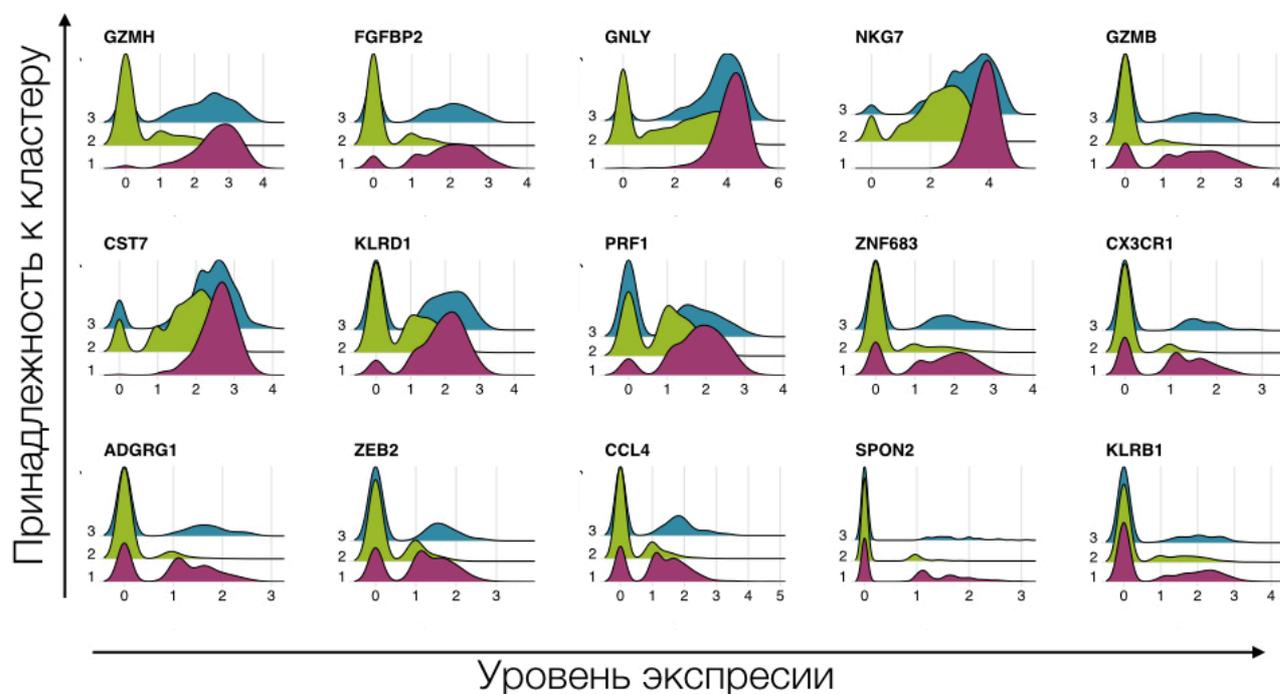


Рис. 33. Экспрессия 15 генов, характерных для клеток в кластере 1, в клетках кластеров 1 (розовый), 2 (зеленый) и 3 (голубой). Клетки кластера 3 имеют смешанный фенотип.

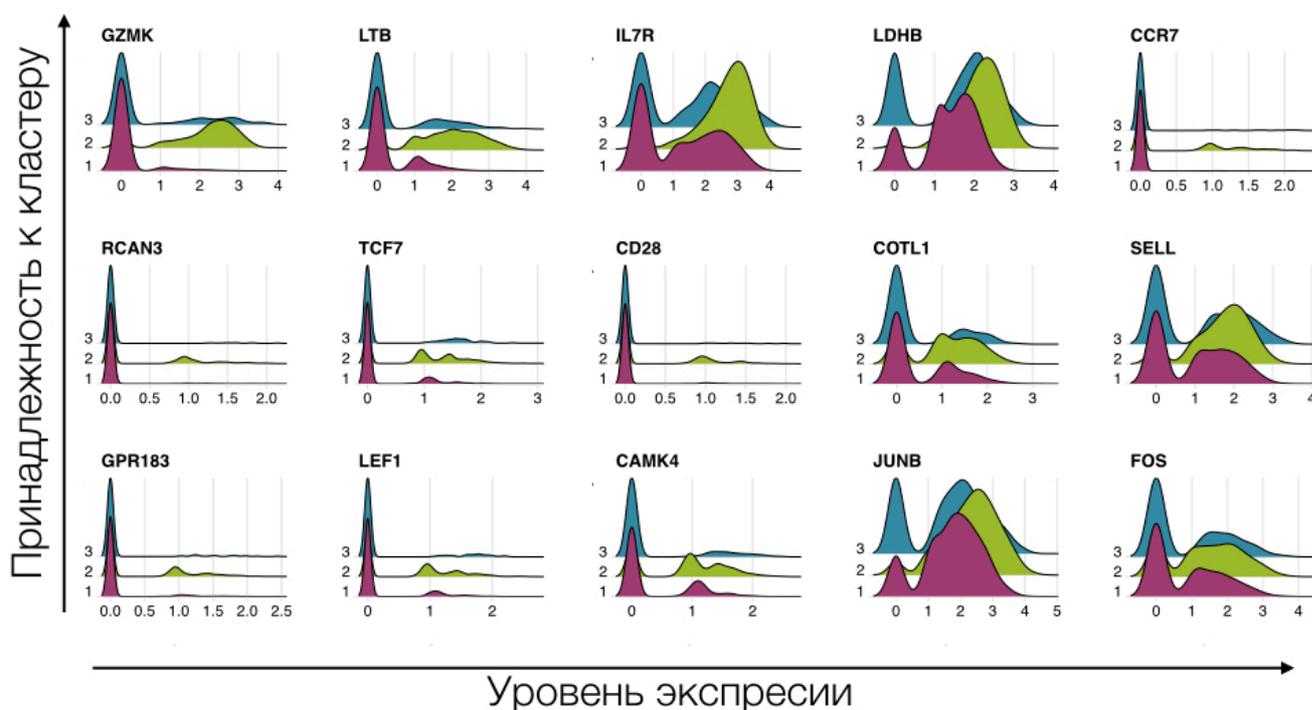


Рис. 34. Экспрессия 15 генов, характерных для клеток в кластере 2, в клетках кластеров 1 (розовый), 2 (зеленый) и 3 (голубой). Клетки кластера 3 имеют смешанный фенотип.

По паттернам экспрессии гранзимов и KLR (“killer-like” рецепторов) в кластерах 1 и 2 можно предположить, что клетки в кластере 2 являются предшественниками клеток кластера 1. Известно, что *GZMK* (обогащен в кластере 2) экспрессируется на более ранних стадиях клеток-памяти [Bratke и др., 2005; Haragi и др., 2009], в то время как экспрессия *GZMB*, *GZMH*, *KLRB1*, *KLRG1* и *ADGRG1* (обогащены в кластере 1) ассоциирована с терминально-дифференцированными клетками памяти с более высоким цитотоксическим потенциалом [Takata, Takiguchi, 2006; Truong и др., 2019]. Интересно, что в кластере 2 клетки также имеют более высокую экспрессию рибосомальных белков – черта, недавно описанная для предшественников клеток памяти [Araki и др., 2017]. Дополнительным доказательством возможности перехода клеток из фенотипа 2 в фенотип 1 служит наличие небольшого кластера клеток 3, которые имеют промежуточный фенотип (Рисунок 33, Рисунок 34). Таким образом, на уровне отдельных клеток были охарактеризованы фенотипы NS4B₂₁₄₋₂₂₂-специфичных Т-клеток памяти через 1.5 года после вакцинации. Было показано наличие двух основных цитотоксических фенотипов Т-клеток памяти, один из которых вероятно является предшественником второго. Взаимосвязь этих фенотипов, а также их сохранение в организме в течении более длительного периода требует дальнейших исследований.

4.2.15. Анализ распределения клонов Т-клеток между фенотипами

Для всех 3500 клеток из scRNAseq эксперимента также были получены данные о парном $\alpha\beta$ TCR. Имея такие данные, можно попробовать выяснить имеется ли место зависимость клеточного фенотипа от последовательности его TCR. Для этого было получено теоретическое распределение клонов между фенотипами, при условии, что клоны распределены между двумя основными фенотипами случайно (голубая кривая плотности на рисунке 35А). Максимум такого теоретического распределения достигается при значении 0.6, что соответствует общей доле клеток в кластере 1 (60%). Оказалось, что реальное распределение клонов между кластерами имеет более пологую и форму (розовая кривая на рисунке 35А). Другими словами, есть ЖЛ-реактивные клоны, которые в представлены только в одном из кластеров.

Для того чтобы соотнести между собой данные об экспрессии и о TCR клонотипе, было решено переделать матрицу генной экспрессии для отдельных клеток таким образом, чтобы каждый ряд представлял собой клон (вместо отдельной клетки), а в столбцах была средняя экспрессия гена в клоне. Полученная матрица экспрессии генов в клонах была обработана программой *Seurat* как обычный scRNAseq. Алгоритм показал, что клоны разделяются на два таких же кластера по экспрессии генов, как и клетки (Рисунок 35В). Для того чтобы проверить, что полученные результаты не являются следствием каких-то других факторов (например,

представленности клонотипа в данных), был поставлен контроль, где в исходной матрице генной экспрессии клонотипы были перемешаны между клетками случайно. В этом случае никаких кластеров алгоритм не выявил, все клоны имели промежуточную экспрессию генов. Таким образом было показано, что TCR клонотипы связаны с фенотипом клеток памяти, причем даже внутри одной антигенной специфичности.

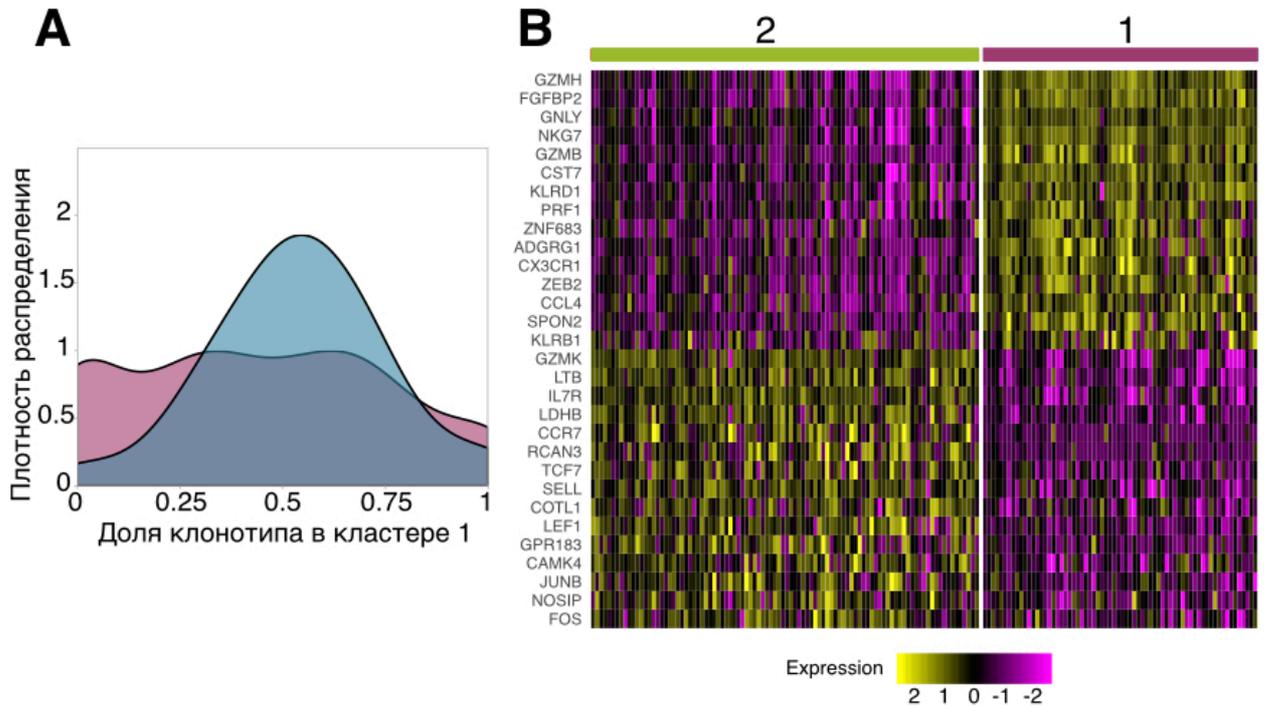


Рис. 35. *А.* Теоретическое (голубое) и наблюдаемое (розовое) распределение TCR клонов между двумя основными фенотипическими кластерами. Наблюдаемое распределение более плоское, чем теоретическое (χ^2 -тест $p=0.0005$). *В.* Тепловая карта 15 наиболее характеристических генов для кластеров клонов 1 и 2.

Полученные результаты позволяют разделить клоны фенотипа 1 и клоны фенотипа 2 и таким образом связать фенотипическую информацию с данными, полученными при секвенировании репертуаров TCR. Не было обнаружено каких-либо особенностей в самих последовательностях TCR, определяющих их принадлежность к какому-либо фенотипу. Так TCR как TRAV12, так и TRAV27 мотивов были обнаружены в обоих фенотипах. Однако распределение по фенотипам было связано с концентрацией клонов после первичной вакцинации (Рисунок 36). Так клоны с более высокой концентрацией были более представлены в кластере 1 терминально-дифференцированных клеток памяти, в то время как клоны с более низкой концентрацией были более представлены в кластере 2. Можно предположить, что фенотип клеток может служить своеобразным сенсором концентрации клеток с определенным TCR, исследования в этом направлении могут представлять большой интерес. Кроме того, следует также упомянуть, что несмотря на так называемую «терминально-

дифференцированную» стадию клонотипы из кластера 1 отвечали на вторую вакцинацию с такой же силой, как и клонотипы в кластере 1. Ранее с помощью экспериментов *in vitro* было показано, что EMRA память, образовавшаяся после острых вирусных инфекций на самом деле обладает большим пролиферативным потенциалом [Akondy и др., 2009; Fuertes Marraco и др., 2015].

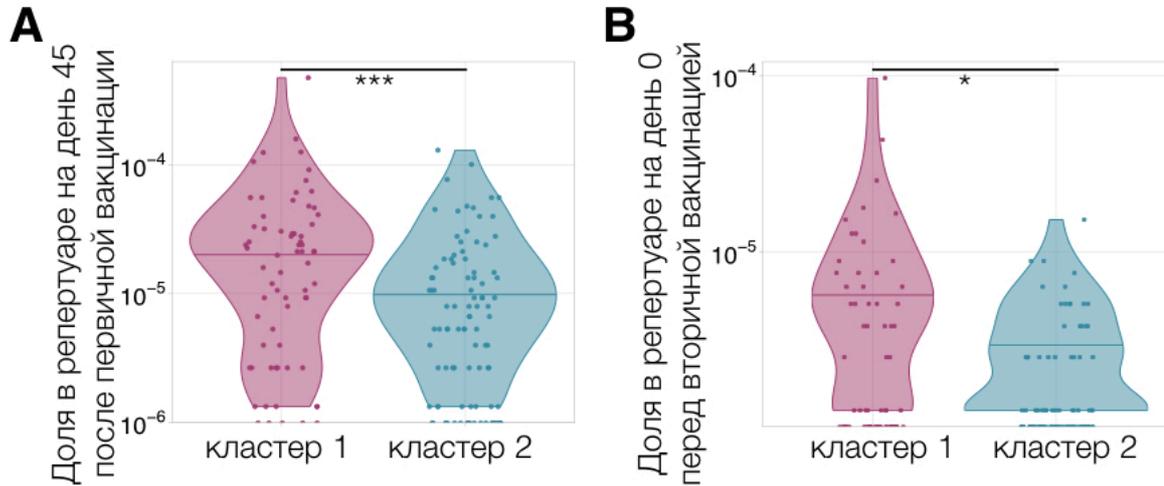


Рис.36. Концентрации клонотипов из фенотипических кластеров 1 и 2 на день 45 (A) и через 1.5 года (B) после первичной вакцинации донора M1. Клонотипы из кластера 1 в среднем имеют более высокую концентрацию в обоих временных точках (U-критерий Манна-Уитни A: $p=0.0003$; B: $p=0.02447$)

4.3. Использование особенностей аминокислотных последовательностей TCR для идентификации ЖЛ-реактивных клонов

Было отмечено, что в процессе иммунного ответа на вакцину от ЖЛ в секвенированных репертуарах появляются кластеры похожих ЖЛ-реактивных клонов (Рисунок 37).

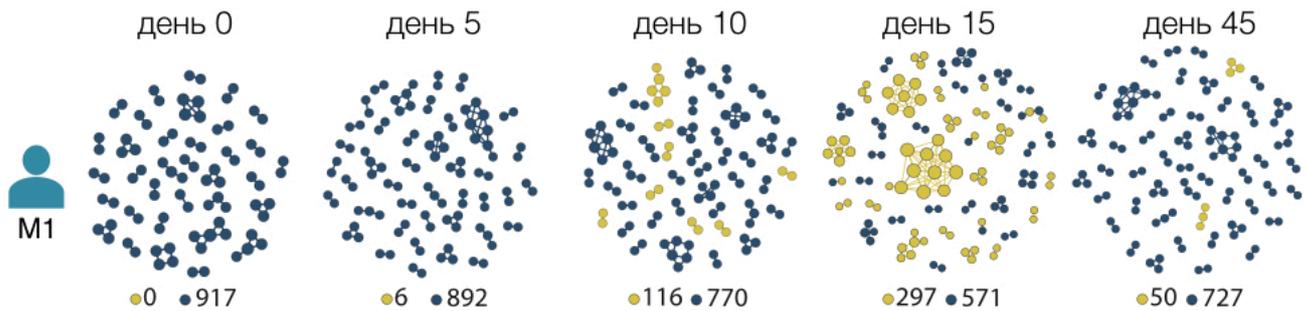


Рис. 37. Граф, показывающий похожие (не более 2 аминокислотных замен) клонотипы среди 1000 самых представленных клонотипов в репертуарах TCR на разные дни после вакцинации от ЖЛ. Иммунизация от ЖЛ приводит к формированию кластеров похожих ЖЛ-реактивных клонотипов (желтые круги), которые не связаны с остальными клонотипами репертуара (синие круги). Внизу указано количество изолированных вершин для каждого из графов.

Формирование таких кластеров ЖЛ-реактивных клонов результат двух процессов: конвергентной рекомбинации и дальнейшей селекции похожих TCR в ответ на одинаковый антигенный стимул. Можно предположить, что любой мощный антигенный стимул будет приводить к образованию в репертуаре кластеров похожих аминокислотных клонотипов. Строго говоря, подобные кластеры существуют и до воздействия антигена, поэтому термин формирование в данном случае не означает, что такие клонотипы формируются *de novo*, а только то, что благодаря селекции и клональной экспансии, они появляются в наших образцах TCR репертуаров. Таким образом, была сформулирована следующая научная проблема: разработка биоинформатического алгоритма, который бы мог выявить клоны, реагирующие на антигенный стимул, используя информацию о последовательностях TCR в единственном TCR репертуаре. Для решения этой задачи был разработан алгоритм ALICE (Antigen-specific Lymphocyte Identification by Clustering of Expanded sequences), который позволяет идентифицировать последовательности TCR, имеющие больше похожих аминокислотных TCR (соседей) в данных, чем ожидается исходя из особенностей сборки TCR (Рисунок 38). Другими словами, ALICE выделяет в данных те кластеры TCR, которые могли образоваться только в

результате конвергентной селекции на одинаковый антиген, исключая те TCR, которые имеют много соседей, поскольку образуются часто в процессе V(D)J-рекомбинации.



Рис. 38. Схема работы ALICE алгоритма для идентификации TCR клонотипов, активно участвующих в иммунном ответе. Репертуары TCR изображены в виде графов, где каждая вершина соответствует индивидуальному клонотипу. Вершины соединяются между собой ребром, если соответствующие им клонотипы похожи между собой. После воздействия антигена происходит клональная экспансия и селекция похожих антиген-распознающих клонотипов (красные кластеры). ALICE алгоритм выявляет вершины с большим количеством ребер, чем ожидается исходя из модели V(D)J-рекомбинации и таким образом отделяет клонотипы, селектированные на антиген (красные), от клонотипов, имеющих много соседей из-за особенностей сборки TCR (голубые, фиолетовые и зеленые кластеры).

Таким образом, для начала нужно сформулировать предсказание о том, сколько соседей для конкретной последовательности TCR ожидается увидеть, то есть нулевую гипотезу.

Для каждой аминокислотной последовательности TCR σ , мы ожидаем, что количество соседей d будет распределено по Пуассону:

$$P(d|\sigma) = e^{-\lambda} \frac{\lambda^d}{d!} \quad (3)$$

где среднее $\lambda = n \sum_{\sigma' \sim \sigma} Q P_{\text{gen}}(\sigma')$.

Суммируем по всем похожим вариантам σ' (соседям) σ , внутри одной VJ комбинации с количеством нуклеотидных вариантов TCR n (каждый нуклеотидный TCR при этом транслируется в соответствующую ему аминокислотную последовательность). Затем процедура повторяется для всех VJ комбинаций в данных. Алгоритм позволяет устанавливать любую меру «похожести» между TCR σ и его соседями σ' . В данном случае σ считали соседом σ' если между их аминокислотными последовательностями было не более одной аминокислотной замены. $P_{\text{gen}}(\sigma')$ – это вероятность сборки аминокислотной последовательности в процессе VDJ-рекомбинации. Q представляет собой коэффициент, учитывающий селекцию клонов Т-клеток в

тимусе [Elhanati и др., 2018], который удаляет из сгенерированных данных часть $1/Q$ последовательностей. Принимали $Q=9.41$, что соответствует среднему значению фактора селекции среди всех VJ комбинаций, описанному в [Pogorelyu и др., 2018a].

Для каждого из аминокислотных TCR σ в реальных данных считали число соседей $d(\sigma)$. Затем для каждого σ , для которого число соседей больше двух $d(\sigma) > 2$, генерировали *in silico* все возможные последовательности с не более чем одним несовпадением в аминокислотной последовательности σ' и определяли их вероятность сборки $P_{\text{gen}}(\sigma')$ методом Монте-Карло как описано в [Pogorelyu и др., 2018a]. Затем рассчитывали p -значение для каждого из σ , означающее вероятность того, что σ имеет больше соседей, чем предсказывает нулевая гипотеза:

$$\sum_{d' \geq d(\sigma)} P(d' | \sigma), \quad (4)$$

с использованием формулы 3. Далее p -значения были скорректированы на множественное тестирование с использованием метода Бенджамини–Хохберга. Аминокислотные последовательности TCR, которые после коррекции имели $p < 0.001$ называли ALICE-клонами. Для того чтобы проверить адекватность работы полученного алгоритма, применили его к опубликованным данным TCR репертуаров наивных клеток (CD45RA+CCR7+) и клеток памяти (CD45RA–CCR7–) [Thome и др., 2016]. Наивные клетки, не подвергались действию антигенной селекции, и поэтому не должны иметь значимых ALICE-клонов. Действительно, большое количество ALICE-клонов было обнаружено в репертуарах клеток памяти, в то время как в подавляющем большинстве наивных репертуаров количество значимых результатов было равно 0 (Рисунок 39А). Таким образом, разработанный алгоритм не дает значимых результатов в условиях отсутствия антигенной стимуляции (репертуар наивных клеток).

Для того, чтобы проверить как ведет себя алгоритм на репертуарах, где ожидается сильная антигенная стимуляция, мы применили его к эксперименту, который называется смешанная лимфоцитарная реакция (mixed lymphocyte reaction – MLR) (данные из [Emerson и др., 2014]). В этой реакции мононуклеары клеток крови двух индивидов, донора и реципиента, смешиваются между собой. При этом клетки донора облучают или используют химические агенты, мешающие их пролиферации. При смешивании клетки реципиента начинают быстро делиться в ответ на антигены, представляемые клетками донора. Оказалось, что ALICE идентифицирует гораздо больше значимых клонов в культуре MLR (после стимуляции), чем в не стимулированных клетках реципиента (Рисунок 39В), в соответствии с ожиданиями. Таким образом, ALICE алгоритм прошел проверку на адекватность с помощью положительного (MLR) и отрицательного (наивные репертуары) контролей.

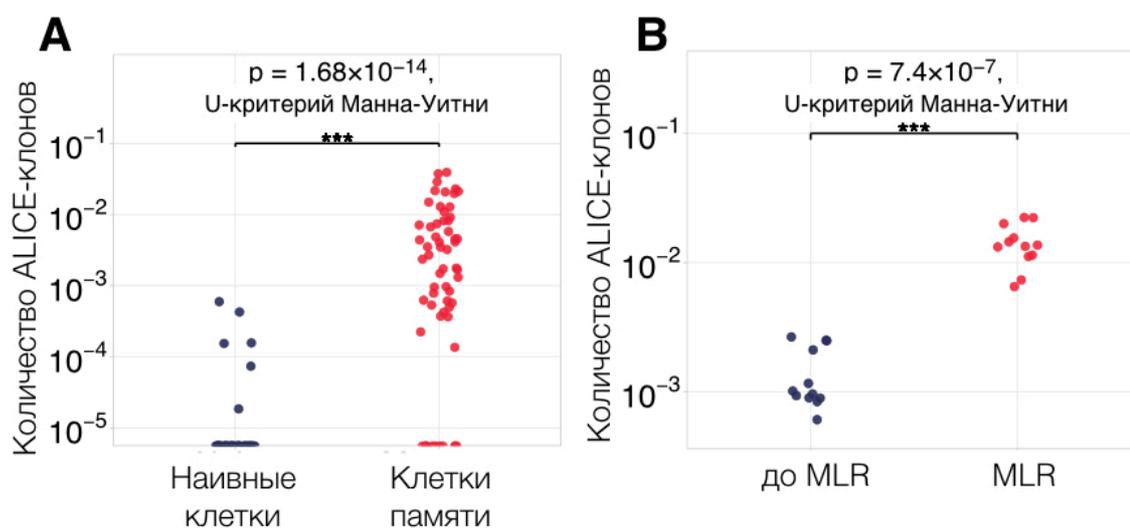


Рис. 39. А. Количество ALICE-клонов, нормализованных на общее число уникальных клонотипов, в TCR репертуарах наивных клеток ($CD45RA+CCR7+$) и клеток памяти ($CD45RA-CCR7-$) (из работы [Thome и др., 2016]). **В.** Количество ALICE-клонов, нормализованных на общее число уникальных клонотипов, в TCR репертуарах клеток до стимуляции и после стимуляции в процессе смешанной лимфоцитарной реакции (*mixed lymphocyte reaction – MLR*) (из работы [Emerson и др., 2014]).

Чтобы проверить имеют ли клоны, идентифицированные ALICE алгоритмом отношение к клонам, реагирующим на антигенный стимул, хорошо подходит модель острой вирусной инфекции на примере вакцинации от ЖЛ. ALICE алгоритм был применен к TCR репертуарам, полученным до вакцинации против ЖЛ (день 0) и на пике иммунного ответа на вакцину (день 15), доноров M1 и P30, и 6 близнецовых доноров (пары доноров S, P, Q), см. рисунок 40. Для всех доноров, кроме одного (Q1), количество ALICE-клонов значительно больше на пике антивирусного ответа. Скорее всего донор Q1 на день 0 болел каким-то параллельным заболеванием. Сравнивая последовательности ALICE-клонов с ранее идентифицированными последовательностями ЖЛ-реактивных клонов для доноров, вакцинированных впервые, получили, что 40–70% ALICE-клонов имеет похожие (не более одной аминокислотной замены) ЖЛ-реактивные TCR. Для донора P30 эффективность работы ALICE алгоритма существенно ниже, что связано с более слабым иммунным ответом и наличием очень небольшого количества похожих ЖЛ-реактивных клонотипов в репертуаре. Таким образом, было показано, что разработанный алгоритм способен выявлять ЖЛ-реактивные клоны с использованием единственной временной точки, используя только сходство последовательности ЖЛ-реактивных TCR.

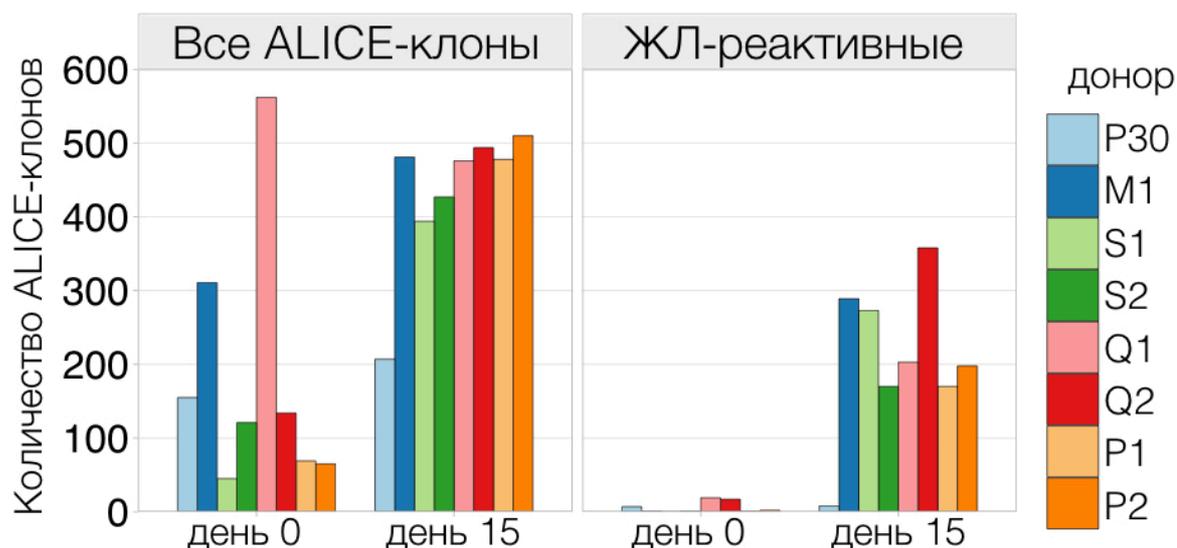


Рис. 40. Идентификация клонотипов, реагирующих на вакцинацию от желтой лихорадки с помощью ALICE алгоритма. Панель слева показывает количество ALICE клонов до вакцинации (день 0) и на пике ответа (день 15) на вакцину от желтой лихорадки для всех доноров. Панель справа показывает количество ALICE-клонотипов, похожих (не более одной аминокислотной замены) или идентичных ЖЛ-реактивным клонотипам, найденным с помощью edgeR.

ALICE алгоритм имеет несколько главных ограничений. Во-первых, он способен идентифицировать TCR, связанные с иммунным ответом, только при условии их достаточно высокой численности и наличии других похожих последовательностей в данных, в то время как большая часть TCR репертуаров состоит из уникальных, ни на что не похожих клонотипов [Murgan и др., 2012]. Использование более сложных мер расстояния между последовательностями TCR [Dash и др., 2017], чем расстояние Хэмминга между аминокислотными последовательностями, а также глубокое секвенирование репертуаров могут существенно увеличить силу алгоритма. Во-вторых, ALICE алгоритм не может различить клонотипы с разной антигенной специфичностью. Так, у доноров с несколькими параллельными заболеваниями будут обнаружены все значимые клоны вне зависимости от антигенного контекста.

Таким образом, разработанный алгоритм, предоставляет инструмент для поиска клонов, активно участвующих в иммунном ответе. Появление подобного анализа может особенно помочь в случаях, когда конкретный антиген неизвестен, например, в аутоиммунных заболеваниях или при исследовании репертуаров неклассических Т-клеток (гамма-дельта, MAIT, NKT, IELC).

5. Заключение

Молекулярная иммунология является одной из самых молодых и динамично развивающихся областей современной биологии. Одна из главных причин такого быстрого развития – появление новых технологий, позволяющих исследовать транскриптомы и геномы отдельных клеток.

В данной работе высокопроизводительное секвенирование TCR α и TCR β репертуаров было использовано для изучения клональной структуры первичного иммунного противовирусного ответа, описания процесса формирования иммунной памяти и реактивации этой памяти при повторной встрече с вирусом. Было показано, что первичная вакцинация от вируса желтой лихорадки вызывает сильную клональную экспансию как CD4, так и CD8 клеток, при этом практически все клональное разнообразие сохраняется после вакцинации в виде различных фенотипов клеток иммунной памяти. В ответ на повторную иммунизацию происходит быстрая реактивация этих клеток памяти, причем это характерно как для ревакцинации через 18 месяцев, так и для ревакцинации через 30 лет.

С помощью секвенирования транскриптомов отдельных клеток, были описаны характеристические мотивы в последовательностях TCR, распознающих иммунодоминантный эпитоп в составе вируса желтой лихорадки. Было показано наличие двух основных структурных решений к связыванию этого пептида и выдвинуто предположение о связи между структурой распознающих TCR и иммунодоминантностью.

Теоретически в TCR репертуаре человека записана вся его история вакцинаций, инфекций и даже предрасположенности к развитию раковых и аутоиммунных заболеваний. Другими словами, TCR репертуар представляет собой медицинскую карту пациента, которую мы пока не научились читать. В настоящее время известны специфичности лишь небольшого количества TCR. Разработанные в данной работе подходы к поиску клонов, активно участвующих в иммунном ответе, могут помочь в накоплении таких знаний, что способствует приближению к главной цели исследований TCR репертуаров – способности предсказать специфичность любого антигенного рецептора на основе его первичной структуры.

6. ВЫВОДЫ

1. Разработан оригинальный методический подход для высокоточного HLA-типирования на основе высокопроизводительного секвенирования кДНК библиотек генов HLA первого и второго классов.
2. Разработаны три оригинальных алгоритма для поиска клонотипов TCR, активно участвующих в иммунном ответе, на основе данных высокопроизводительного секвенирования TCR репертуаров.
3. С использованием разработанных алгоритмов выявлены TCR α и TCR β клонотипы, реагирующие на первичную и вторичную вакцинацию от желтой лихорадки. Мониторинг концентрации ЖЛ-реактивных клонотипов в различных временных точках после вакцинаций показал, что вторичная вакцинация вызывает в 10 раз более слабый, но быстрее развивающийся T-клеточный иммунный ответ.
4. Показано, что число и общая доля ЖЛ-реактивных клонотипов в репертуаре могут быть воспроизводимо и независимо определены с использованием секвенирования как α , так и β -цепей TCR. Предложен оригинальный биоинформатический алгоритм восстановления $\alpha\beta$ пар TCR на основе сходства клональных траекторий TCR α и TCR β во времени.
5. Показано, что более 85% клонального разнообразия ЖЛ-реактивных репертуаров сохраняется в периферической крови в течении как минимум 1.5 лет после первичной вакцинации от желтой лихорадки. Для цитотоксических ЖЛ-реактивных клонов показана смена фенотипа из эффекторной памяти (EM) в терминально-дифференцированную эффекторную память (EMRA) между 15 и 45 днем после иммунизации.
6. Показано, что более 60% цитотоксического иммунного ответа на вакцину от желтой лихорадки может быть специфично к единственному эпитопу вируса. Идентифицированы и охарактеризованы два основных мотива в аминокислотных последовательностях $\alpha\beta$ TCR, связывающих этот иммунодоминантный пептид.
7. Анализ транскриптомов единичных T-клеток памяти, специфичных к иммунодоминантному эпитопу, после первичной вакцинации выявил наличие двух основных фенотипов и неслучайное распределение клонов T-клеток между этими фенотипами.

7. Благодарности

Я бы хотела поблагодарить всех сотрудников лаборатории сравнительной и функциональной геномики, без участия которых невозможно было бы выполнение этой работы. Мамедова Ильгара Зияддиновича и Лебедева Юрия Борисовича за руководство, помощь в организации экспериментов и конструктивную критику. Екатерине Комеч за оптимизм и готовность долгими днями сортировать Т-клетки памяти. Отдельно хотелось бы поблагодарить Погорелого Михаила за активное участие в проведении экспериментов и постоянную поддержку.

Выражаю благодарность нашим коллегам из Германии: Элизе Розати, Петре Бахер и Андре Франке за помощь в проведении эксперимента по секвенированию единичных клеток. Особое спасибо хочу сказать Александре Вальчак и Тьерри Мора, сотрудникам Высшей Нормальной Школы в Париже, за приятное и конструктивное сотрудничество.

Спасибо моей семье за заботу и проявленный интерес к моей работе.

8. Список сокращений

а.о. – аминокислотный остаток

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖЛ – желтая лихорадка

нт. – нуклеотид

п.н. – пары нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

BCR (B-cell receptor) – В-клеточный рецептор

CD (cluster of differentiation) – кластер дифференцировки

CDR (complementarity determining region) - участок, определяющий комплементарность

CM (central memory) – центральная память

CMV – цитомегаловирус

EBV – вирус Эпштейна-Барр

EM (effector memory) – эффекторная память

EMRA (effector memory CD45RA+) – терминально-дифференцированная эффекторная память

HLA (human leucocyte antigen) – человеческий лейкоцитарный антиген

HTS (high-throughput sequencing) – высокопроизводительное секвенирование

MHC (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости

MLR (mixer lymphocyte reaction) – смешанная лимфоцитарная реакция

PBMC (peripheral mononuclear cells) – мононуклеары периферической крови

RSS (recombination signal sequence) – сигнальная последовательность рекомбинации

TCR (T-cell receptor) – Т-клеточный рецептор

TCR-pMHC – комплекс TCR-MHC-пептид

Tscm (stem cell-like memory) – “наивная” память

UMI (unique molecular identifier) – уникальный молекулярный идентификатор

YFV17D – вакцинный штамм вируса желтой лихорадки

9. Список литературы

1. Adams E.J., Gu S., Luoma A.M. Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition // *Cellular Immunology*. 2015. Т. 296. № 1. С. 31–40.
2. Afik S. и др. Targeted reconstruction of T cell receptor sequence from single cell RNA-seq links CDR3 length to T cell differentiation state // *Nucleic Acids Research*. 2017. Т. 45. № 16. С. e148–e148.
3. Ahmadzadeh M. и др. Tumor-infiltrating human CD4⁺ regulatory T cells display a distinct TCR repertoire and exhibit tumor and neoantigen reactivity // *Sci Immunol*. 2019. Т. 4. № 31.
4. Ahmed R. и др. A Public BCR Present in a Unique Dual-Receptor-Expressing Lymphocyte from Type 1 Diabetes Patients Encodes a Potent T Cell Autoantigen // *Cell*. 2019. Т. 177. № 6. С. 1583–1599.e16.
5. Ahmed R., Akondy R.S. Insights into human CD8⁺ T-cell memory using the yellow fever and smallpox vaccines // *Immunology and Cell Biology*. 2011. Т. 89. № 3. С. 340–345.
6. Akondy R.S. и др. The Yellow Fever Virus Vaccine Induces a Broad and Polyfunctional Human Memory CD8⁺ T Cell Response // *J Immunol*. 2009. Т. 183. № 12. С. 7919–7930.
7. Akondy R.S. и др. Initial viral load determines the magnitude of the human CD8 T cell response to yellow fever vaccination // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015. Т. 112. № 10. С. 3050–3055.
8. Akondy R.S. и др. Origin and differentiation of human memory CD8 T cells after vaccination // *Nature*. 2017. Т. 552. № 7685. С. 362–367.
9. Allez M. и др. T cell clonal expansions in ileal Crohn's disease are associated with smoking behaviour and postoperative recurrence // *Gut*. 2019. Т. 68. № 11. С. 1961–1970.
10. Altman J.D. и др. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. // *Science (New York, N.Y.)*. 1996. Т. 274. № 5284. С. 94–6.
11. Amaria R.N. и др. Publisher Correction: Neoadjuvant immune checkpoint blockade in high-risk resectable melanoma // *Nat. Med*. 2018. Т. 24. № 12. С. 1942.
12. Andreatta M., Nielsen M. Gapped sequence alignment using artificial neural networks: application to the MHC class I system // *Bioinformatics*. 2016. Т. 32. № 4. С. 511–517.
13. Araki K. и др. Translation is actively regulated during the differentiation of CD8⁺ effector T cells // *Nat. Immunol*. 2017. Т. 18. № 9. С. 1046–1057.
14. Bagaev D.V. и др. VDJdb in 2019: database extension, new analysis infrastructure and a T-cell receptor motif compendium // *Nucleic Acids Research*. 2019. С. gkz874.
15. Balakrishnan A., Morris G.P. The highly alloreactive nature of dual TCR T cells // *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2016. Т. 21. № 1. С. 22–28.
16. Bansal K. и др. The transcriptional regulator Aire binds to and activates super-enhancers // *Nature Immunology*. 2017. Т. 18. № 3. С. 263–273.
17. Bassing C.H., Swat W., Alt F.W. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination // *Cell*. 2002. Т. 109. № 2 SUPPL. 1. С. 45–55.
18. Best K. и др. Computational analysis of stochastic heterogeneity in PCR amplification efficiency revealed by single molecule barcoding // *Sci Rep*. 2015. Т. 5. С. 14629.
19. Blom K. и др. Temporal Dynamics of the Primary Human T Cell Response to Yellow Fever Virus 17D As It Matures from an Effector- to a Memory-Type Response // *J.I.* 2013. Т. 190. № 5. С. 2150–2158.

20. Bolotin D.A. и др. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling // *Nat. Methods*. 2015. Т. 12. № 5. С. 380–381.
21. Borrman T. и др. ATLAS: A database linking binding affinities with structures for wild-type and mutant TCR-pMHC complexes // *Proteins*. 2017. Т. 85. № 5. С. 908–916.
22. Bovay A. и др. T cell receptor alpha variable 12-2 bias in the immunodominant response to Yellow fever virus // *Eur. J. Immunol.* 2018. Т. 48. № 2. С. 258–272.
23. Boyd S.D., Crowe J.E. Deep sequencing and human antibody repertoire analysis // *Curr. Opin. Immunol.* 2016. Т. 40. С. 103–109.
24. Bratke K. и др. Differential expression of human granzymes A, B, and K in natural killer cells and during CD8+ T cell differentiation in peripheral blood // *Eur. J. Immunol.* 2005. Т. 35. № 9. С. 2608–2616.
25. Britanova O.V. и др. Dynamics of Individual T Cell Repertoires: From Cord Blood to Centenarians // *J. Immunol.* 2016. Т. 196. № 12. С. 5005–5013.
26. Butler A. и др. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species // *Nat Biotechnol.* 2018. Т. 36. № 5. С. 411–420.
27. Cantor H., Boyse E.A. Functional subclasses of T-lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T-cell subclasses is a differentiative process independent of antigen // *J. Exp. Med.* 1975. Т. 141. № 6. С. 1376–1389.
28. Chaara W. и др. RepSeq Data Representativeness and Robustness Assessment by Shannon Entropy // *Front. Immunol.* 2018. Т. 9. С. 1038.
29. Chambers T.J., Grakoui A., Rice C.M. Processing of the yellow fever virus nonstructural polyprotein: a catalytically active NS3 proteinase domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites. // *Journal of virology.* 1991. Т. 65. № 11. С. 6042–50.
30. Chapuis A.G. и др. Tracking the Fate and Origin of Clinically Relevant Adoptively Transferred CD8+ T Cells In Vivo // *Sci Immunol.* 2017. Т. 2. № 8.
31. Co M.D.T., Kilpatrick E.D., Rothman A.L. Dynamics of the CD8 T-cell response following yellow fever virus 17D immunization. // *Immunology.* 2009. Т. 128. № 1 Suppl. С. e718-27.
32. Cole C. и др. Highly Accurate Sequencing of Full-Length Immune Repertoire Amplicons Using Tn5-Enabled and Molecular Identifier-Guided Amplicon Assembly // *J. Immunol.* 2016. Т. 196. № 6. С. 2902–2907.
33. Dash P. и др. Quantifiable predictive features define epitope-specific T cell receptor repertoires // *Nature.* 2017. Т. 547. № 7661. С. 89–93.
34. Davis M.M., Altman J.D., Newell E.W. Interrogating the repertoire: Broadening the scope of peptide-MHC multimer analysis // *Nature Reviews Immunology.* 2011. Т. 11. № 8. С. 551–558.
35. Davis M.M., Bjorkman P.J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition // *Nature.* 1988. Т. 334. № 6181. С. 395–402.
36. De Neuter N. и др. On the feasibility of mining CD8+ T cell receptor patterns underlying immunogenic peptide recognition // *Immunogenetics.* 2018. Т. 70. № 3. С. 159–168.
37. De Neuter N. и др. Memory CD4+ T cell receptor repertoire data mining as a tool for identifying cytomegalovirus serostatus // *Genes Immun.* 2019. Т. 20. № 3. С. 255–260.
38. De Simone M., Rossetti G., Pagani M. Single Cell T Cell Receptor Sequencing: Techniques and Future Challenges // *Front Immunol.* 2018. Т. 9. С. 1638.
39. Dendrou C.A. и др. HLA variation and disease // *Nat. Rev. Immunol.* 2018. Т. 18. № 5. С. 325–339.

40. DeWitt W.S. и др. Dynamics of the Cytotoxic T Cell Response to a Model of Acute Viral Infection // *J. Virol.* 2015. Т. 89. № 8. С. 4517–4526.
41. DeWitt W.S. и др. Human T cell receptor occurrence patterns encode immune history, genetic background, and receptor specificity // *Elife.* 2018. Т. 7.
42. Duez M. и др. Vidjil: A Web Platform for Analysis of High-Throughput Repertoire Sequencing // *PLoS ONE.* 2016. Т. 11. № 11. С. e0166126.
43. Dupic T. и др. Genesis of the $\alpha\beta$ T-cell receptor // *PLoS Comput Biol.* 2019. Т. 15. № 3. С. e1006874.
44. Elhanati Y. и др. Inferring processes underlying B-cell repertoire diversity // 2015.
45. Elhanati Y. и др. RepgenHMM: A dynamic programming tool to infer the rules of immune receptor generation from sequence data // *Bioinformatics.* 2016. Т. 32. № 13. С. 1943–1951.
46. Elhanati Y. и др. Predicting the spectrum of TCR repertoire sharing with a data-driven model of recombination // *Immunol. Rev.* 2018. Т. 284. № 1. С. 167–179.
47. Emerson R.O. и др. Defining the Alloreactive T Cell Repertoire Using High-Throughput Sequencing of Mixed Lymphocyte Reaction Culture // *PLoS ONE.* 2014. Т. 9. № 11. С. e111943.
48. Emerson R.O. и др. Immunosequencing identifies signatures of cytomegalovirus exposure history and HLA-mediated effects on the T cell repertoire // *Nat. Genet.* 2017. Т. 49. № 5. С. 659–665.
49. Faham M. и др. Discovery of T Cell Receptor β Motifs Specific to HLA-B27-Positive Ankylosing Spondylitis by Deep Repertoire Sequence Analysis // *Arthritis & Rheumatology (Hoboken, N.J.).* 2017. Т. 69. № 4. С. 774–784.
50. Finak G. и др. MAST: a flexible statistical framework for assessing transcriptional changes and characterizing heterogeneity in single-cell RNA sequencing data // *Genome Biol.* 2015. Т. 16. № 1. С. 278.
51. Forde P.M. и др. Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Lung Cancer // *N Engl J Med.* 2018. Т. 378. № 21. С. 1976–1986.
52. Freed Eric., Martin M. *Fields Virology.* , 2013. 453–490 с.
53. Freeman J.D. и др. Profiling the T-cell receptor beta-chain repertoire by massively parallel sequencing // *Genome Res.* 2009. Т. 19. № 10. С. 1817–1824.
54. Friedensohn S., Khan T.A., Reddy S.T. Advanced Methodologies in High-Throughput Sequencing of Immune Repertoires // *Trends Biotechnol.* 2017. Т. 35. № 3. С. 203–214.
55. Fuertes Marraco S.A. и др. Long-lasting stem cell-like memory CD8⁺ T cells with a naïve-like profile upon yellow fever vaccination // *Sci Transl Med.* 2015. Т. 7. № 282. С. 282ra48.
56. Fürst D. и др. High-resolution HLA matching in hematopoietic stem cell transplantation: a retrospective collaborative analysis // *Blood.* 2013. Т. 122. № 18. С. 3220–3229.
57. Gfeller D. и др. The Length Distribution and Multiple Specificity of Naturally Presented HLA-I Ligands // *J. Immunol.* 2018. Т. 201. № 12. С. 3705–3716.
58. Gielis S. и др. Detection of Enriched T Cell Epitope Specificity in Full T Cell Receptor Sequence Repertoires // *Front. Immunol.* 2019. Т. 10. С. 2820.
59. Glanville J. и др. Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire // *Nature.* 2017. Т. 547. № 7661. С. 94–98.
60. Gros A. и др. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients // *Nat. Med.* 2016. Т. 22. № 4. С. 433–438.

61. Han A. и др. Linking T-cell receptor sequence to functional phenotype at the single-cell level // *Nat. Biotechnol.* 2014. Т. 32. № 7. С. 684–692.
62. Harari A. и др. Distinct profiles of cytotoxic granules in memory CD8 T cells correlate with function, differentiation stage, and antigen exposure // *J. Virol.* 2009. Т. 83. № 7. С. 2862–2871.
63. Howie B. и др. High-throughput pairing of T cell receptor a and b sequences // *Science Translational Medicine.* 2015. Т. 7. № 301. С. 301ra131-301ra131.
64. James E.A. и др. Yellow Fever Vaccination Elicits Broad Functional CD4⁺ T Cell Responses That Recognize Structural and Nonstructural Proteins // *J. Virol.* 2013. Т. 87. № 23. С. 12794–12804.
65. Jeannet G. и др. Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. Т. 107. № 21. С. 9777–9782.
66. Jung Y.W. и др. CCR7 expression alters memory CD8 T-cell homeostasis by regulating occupancy in IL-7- and IL-15-dependent niches // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016. Т. 113. № 29. С. 8278–8283.
67. Kabelitz D., Déchanet-Merville J. Editorial: «Recent advances in gamma/delta T cell biology: New ligands, new functions, and new translational perspectives» // *Frontiers in Immunology.* 2015. Т. 6. № JUL. С. 4–9.
68. Kaech S.M. и др. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells // *Nat. Immunol.* 2003. Т. 4. № 12. С. 1191–1198.
69. Kaplinsky J., Arnaout R. Robust estimates of overall immune-repertoire diversity from high-throughput measurements on samples // *Nat Commun.* 2016. Т. 7. № 1. С. 11881.
70. Khan J.M., Ranganathan S. Understanding TR binding to pMHC complexes: How does a TR scan many pMHC complexes yet preferentially bind to one // *PLoS ONE.* 2011. Т. 6. № 2.
71. Kisielow P. и др. Ly antigens as markers for functionally distinct subpopulations of thymus-derived lymphocytes of the mouse // *Nature.* 1975. Т. 253. № 5488. С. 219–220.
72. Kitaura K. и др. A new high-throughput sequencing method for determining diversity and similarity of T cell receptor (TCR) α and β repertoires and identifying potential new invariant TCR α chains // *BMC Immunol.* 2016. Т. 17. № 1. С. 38.
73. Kivioja T. и др. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers // *Nat. Methods.* 2011. Т. 9. № 1. С. 72–74.
74. Klein L. и др. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction // *Nature Reviews Immunology.* 2009. Т. 9. № 12. С. 833–844.
75. Kohler S. и др. The early cellular signatures of protective immunity induced by live viral vaccination: Immunity to infection // *Eur. J. Immunol.* 2012. Т. 42. № 9. С. 2363–2373.
76. Komech E.A. и др. CD8⁺ T cells with characteristic T cell receptor beta motif are detected in blood and expanded in synovial fluid of ankylosing spondylitis patients // *Rheumatology (Oxford).* 2018. Т. 57. № 6. С. 1097–1104.
77. Kongsgaard M. и др. Adaptive immune responses to booster vaccination against yellow fever virus are much reduced compared to those after primary vaccination // *Sci Rep.* 2017. Т. 7. № 1. С. 662.
78. Kraj P., Ignatowicz L. The mechanisms shaping the repertoire of CD4⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells // *Immunology.* 2018. Т. 153. № 3. С. 290–296.
79. Krangel M.S. Mechanics of T cell receptor gene rearrangement // *Current Opinion in Immunology.* 2009. Т. 21. № 2. С. 133–139.
80. Kuchenbecker L. и др. IMSEQ--a fast and error aware approach to immunogenetic sequence analysis // *Bioinformatics.* 2015. Т. 31. № 18. С. 2963–2971.

81. Latorre D. и др. T cells in patients with narcolepsy target self-antigens of hypocretin neurons // *Nature*. 2018. Т. 562. № 7725. С. 63–68.
82. Laydon D.J. и др. Quantification of HTLV-1 clonality and TCR diversity // *PLoS Comput. Biol.* 2014. Т. 10. № 6. С. e1003646.
83. Laydon D.J., Bangham C.R.M., Asquith B. Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2015. Т. 370. № 1675. С. 20140291.
84. Lee E.S. и др. Identifying T Cell Receptors from High-Throughput Sequencing: Dealing with Promiscuity in TCR α and TCR β Pairing // *PLoS Comput Biol.* 2017. Т. 13. № 1. С. e1005313.
85. Lee S.M., Chao A. Estimating population size via sample coverage for closed capture-recapture models // *Biometrics*. 1994. Т. 50. № 1. С. 88–97.
86. Li B. и др. Ultrasensitive detection of TCR hypervariable-region sequences in solid-tissue RNA-seq data // *Nat Genet.* 2017. Т. 49. № 4. С. 482–483.
87. Lin S.G. и др. Highly sensitive and unbiased approach for elucidating antibody repertoires // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016. Т. 113. № 28. С. 7846–7851.
88. Link C.S. и др. Abundant cytomegalovirus (CMV) reactive clonotypes in the CD8(+) T cell receptor alpha repertoire following allogeneic transplantation // *Clin. Exp. Immunol.* 2016. Т. 184. № 3. С. 389–402.
89. Linnemann C. и др. High-throughput identification of antigen-specific TCRs by TCR gene capture // *Nat. Med.* 2013. Т. 19. № 11. С. 1534–1541.
90. Lyskov S., Gray J.J. The RosettaDock server for local protein-protein docking // *Nucleic Acids Res.* 2008. Т. 36. № Web Server issue. С. W233-238.
91. Mamedov I.Z. и др. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling // *Front Immunol.* 2013. Т. 4. С. 456.
92. Marcou Q., Mora T., Walczak A.M. IGoR: a tool for high-throughput immune repertoire analysis // 2017. С. 1–34.
93. Matos T.R. и др. Clinically resolved psoriatic lesions contain psoriasis-specific IL-17-producing $\alpha\beta$ T cell clones // *J. Clin. Invest.* 2017. Т. 127. № 11. С. 4031–4041.
94. Matz M. и др. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR // *Nucleic Acids Res.* 1999. Т. 27. № 6. С. 1558–1560.
95. McCutcheon J.A. и др. Low HLA-C expression at cell surfaces correlates with increased turnover of heavy chain mRNA // *J. Exp. Med.* 1995. Т. 181. № 6. С. 2085–2095.
96. Melo A.B. de и др. T-Cell Memory Responses Elicited by Yellow Fever Vaccine are Targeted to Overlapping Epitopes Containing Multiple HLA-I and -II Binding Motifs // *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013. Т. 7. № 1.
97. Meng W. и др. An atlas of B-cell clonal distribution in the human body // *Nat. Biotechnol.* 2017. Т. 35. № 9. С. 879–884.
98. Miho E. и др. Computational Strategies for Dissecting the High-Dimensional Complexity of Adaptive Immune Repertoires // *Front Immunol.* 2018. Т. 9. С. 224.
99. Miller J.D. и др. Human Effector and Memory CD8⁺ T Cell Responses to Smallpox and Yellow Fever Vaccines // *Immunity*. 2008. Т. 28. № 5. С. 710–722.
100. Mold J.E. и др. Clonally distinct differentiation trajectories shape CD8⁺ memory T cell heterogeneity after acute viral infections in humans. : *Immunology*, 2019.

101. Monath T.P. и др. Live virus vaccines based on a yellow fever vaccine backbone: Standardized template with key considerations for a risk/benefit assessment // *Vaccine*. 2015. Т. 33. № 1. С. 62–72.
102. Moore J.R. и др. Dependence of CD8 T Cell Response upon Antigen Load During Primary Infection : Analysis of Data from Yellow Fever Vaccination // *Bull. Math. Biol.* 2019. Т. 81. № 7. С. 2553–2568.
103. Morris H. и др. Tracking donor-reactive T cells: Evidence for clonal deletion in tolerant kidney transplant patients // *Sci Transl Med*. 2015. Т. 7. № 272. С. 272ra10.
104. Mösch A. и др. Machine Learning for Cancer Immunotherapies Based on Epitope Recognition by T Cell Receptors // *Front. Genet.* 2019. Т. 10. С. 1141.
105. Most R.G. van Der и др. Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. // *Journal of virology*. 2000. Т. 74. № 17. С. 8094–101.
106. Murphy K., Weaver C. Janeway ' S 9 Th Edition. , 2016.
107. Murugan A. и др. Statistical inference of the generation probability of T-cell receptors from sequence repertoires // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. Т. 109. № 40. С. 16161–16166.
108. Nazarov V.I. и др. tcR: an R package for T cell receptor repertoire advanced data analysis // *BMC Bioinformatics*. 2015. Т. 16. С. 175.
109. Nazarov V.I. и др. Reliability of immune receptor rearrangements as genetic markers for minimal residual disease monitoring // *Bone Marrow Transplantation*. 2016. Т. 51. № 10. С. 1408–1410.
110. Nielsen M. и др. The role of the proteasome in generating cytotoxic T-cell epitopes: insights obtained from improved predictions of proteasomal cleavage // *Immunogenetics*. 2005. Т. 57. № 1–2. С. 33–41.
111. Nielsen M., Andreatta M. NNAlign: a platform to construct and evaluate artificial neural network models of receptor-ligand interactions // *Nucleic Acids Res*. 2017. Т. 45. № W1. С. W344–W349.
112. Norrby E. Yellow fever and Max Theiler: the only Nobel Prize for a virus vaccine // *J. Exp. Med*. 2007. Т. 204. № 12. С. 2779–2784.
113. Oakes T. и др. 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. Т. 8. С. 1267.
114. Oh D.Y. и др. Immune Toxicities Elicited by CTLA-4 Blockade in Cancer Patients Are Associated with Early Diversification of the T-cell Repertoire // *Cancer Res*. 2017. Т. 77. № 6. С. 1322–1330.
115. Patil V.S. и др. Precursors of human CD4+ cytotoxic T lymphocytes identified by single-cell transcriptome analysis // *Sci Immunol*. 2018. Т. 3. № 19.
116. Pierce B.G., Weng Z. A flexible docking approach for prediction of T cell receptor-peptide-MHC complexes // *Protein Sci*. 2013. Т. 22. № 1. С. 35–46.
117. Pogorelyy M.V. и др. Persisting fetal clonotypes influence the structure and overlap of adult human T cell receptor repertoires // *PLoS Comput Biol*. 2017. Т. 13. № 7. С. e1005572.
118. Pogorelyy M.V. и др. Method for identification of condition-associated public antigen receptor sequences // *eLife*. 2018a. Т. 7. С. e33050.
119. Pogorelyy M.V. и др. Precise tracking of vaccine-responding T cell clones reveals convergent and personalized response in identical twins // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018b. Т. 115. № 50. С. 12704–12709.

120. Poland J.D. и др. Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine // *Bull. World Health Organ.* 1981. Т. 59. № 6. С. 895–900.
121. Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology // *Nature Reviews Immunology.* 2009. Т. 9. № 10. С. 741–747.
122. Putintseva E.V. и др. Mother and Child T Cell Receptor Repertoires: Deep Profiling Study // *Front. Immunol.* 2013. Т. 4.
123. Qi Q. и др. Diversification of the antigen-specific T cell receptor repertoire after varicella zoster vaccination // *Sci Transl Med.* 2016. Т. 8. № 332. С. 332ra46.
124. Quigley M.F. и др. Unbiased molecular analysis of T cell receptor expression using template-switch anchored RT-PCR // *Curr Protoc Immunol.* 2011. Т. Chapter 10. С. Unit10.33.
125. Rius C. и др. Peptide-MHC Class I Tetramers Can Fail To Detect Relevant Functional T Cell Clonotypes and Underestimate Antigen-Reactive T Cell Populations // *J. Immunol.* 2018. Т. 200. № 7. С. 2263–2279.
126. Robert L. и др. CTLA4 blockade broadens the peripheral T-cell receptor repertoire // *Clin. Cancer Res.* 2014. Т. 20. № 9. С. 2424–2432.
127. Robins H.S. и др. Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells // *Blood.* 2009. Т. 114. № 19. С. 4099–4107.
128. Robinson J. и др. The IMGT/HLA database // *Nucleic Acids Research.* 2013. Т. 41. № D1. С. 1222–1227.
129. Robinson J. и др. Distinguishing functional polymorphism from random variation in the sequences of >10,000 HLA-A, -B and -C alleles // *PLoS Genetics.* 2017. Т. 13. № 6. С. 1–28.
130. Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data // *Bioinformatics.* 2010. Т. 26. № 1. С. 139–140.
131. Rodenko B. и др. Generation of peptide-MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange // *Nat Protoc.* 2006. Т. 1. № 3. С. 1120–1132.
132. Roh W. и др. Integrated molecular analysis of tumor biopsies on sequential CTLA-4 and PD-1 blockade reveals markers of response and resistance // *Sci Transl Med.* 2017. Т. 9. № 379.
133. Rosati E. и др. Overview of methodologies for T-cell receptor repertoire analysis // *BMC Biotechnol.* 2017. Т. 17. № 1. С. 61.
134. Ruggiero E. и др. High-resolution analysis of the human T-cell receptor repertoire // *Nat Commun.* 2015. Т. 6. С. 8081.
135. Sandt C.E. van de и др. Challenging immunodominance of influenza-specific CD8+ T cell responses restricted by the risk-associated HLA-A*68:01 allomorph // *Nat Commun.* 2019. Т. 10. № 1. С. 5579.
136. Sathaliyawala T. и др. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets // *Immunity.* 2013. Т. 38. № 1. С. 187–197.
137. Schaller S. и др. ImmunExplorer (IMEX): a software framework for diversity and clonality analyses of immunoglobulins and T cell receptors on the basis of IMGT/HighV-QUEST preprocessed NGS data // *BMC Bioinformatics.* 2015. Т. 16. С. 252.
138. Schluns K.S. и др. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo // *Nat. Immunol.* 2000. Т. 1. № 5. С. 426–432.
139. Schritt D. и др. Repertoire Builder: high-throughput structural modeling of B and T cell receptors // *Mol. Syst. Des. Eng.* 2019. Т. 4. № 4. С. 761–768.

140. Schuldt N.J., Binstadt B.A. Dual TCR T Cells: Identity Crisis or Multitaskers? // *J. Immunol.* 2019. T. 202. № 3. С. 637–644.
141. Seay H.R. и др. Tissue distribution and clonal diversity of the T and B cell repertoire in type 1 diabetes // *JCI Insight.* 2016. T. 1. № 20.
142. Sethna Z. и др. OLGA: fast computation of generation probabilities of B- and T-cell receptor amino acid sequences and motifs // *Bioinformatics.* 2019. T. 35. № 17. С. 2974–2981.
143. Shugay M. и др. Towards error-free profiling of immune repertoires // *Nat Methods.* 2014. T. 11. № 6. С. 653–655.
144. Shugay M. и др. VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires // *PLoS Comput. Biol.* 2015. T. 11. № 11. С. e1004503.
145. Shugay M. и др. VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity // *Nucleic Acids Res.* 2018. T. 46. № D1. С. D419–D427.
146. Sidney J. и др. Quantitative peptide binding motifs for 19 human and mouse MHC class I molecules derived using positional scanning combinatorial peptide libraries // *Immunome Research.* 2008. T. 4. № 1. С. 1–14.
147. Silva-Santos B., Strid J. $\gamma\delta$ T cells get adaptive // *Nature Immunology.* 2017. T. 18. № 4. С. 370–372.
148. Simon A. и др. Function-related regulation of the stability of MHC proteins // *Biophysical Journal.* 2000. T. 79. № 5. С. 2305–2313.
149. Six A. и др. The past, present, and future of immune repertoire biology - the rise of next-generation repertoire analysis // *Front Immunol.* 2013. T. 4. С. 413.
150. Song I. и др. Broad TCR repertoire and diverse structural solutions for recognition of an immunodominant CD8+ T cell epitope // *Nat Struct Mol Biol.* 2017. T. 24. № 4. С. 395–406.
151. Stuart T. и др. Comprehensive Integration of Single-Cell Data // *Cell.* 2019. T. 177. № 7. С. 1888–1902.e21.
152. Subudhi S.K. и др. Clonal expansion of CD8 T cells in the systemic circulation precedes development of ipilimumab-induced toxicities // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016. T. 113. № 42. С. 11919–11924.
153. Suessmuth Y. и др. CMV reactivation drives posttransplant T-cell reconstitution and results in defects in the underlying TCR β repertoire // *Blood.* 2015. T. 125. № 25. С. 3835–3850.
154. Sycheva A.L. и др. Quantitative profiling reveals minor changes of T cell receptor repertoire in response to subunit inactivated influenza vaccine // *Vaccine.* 2018. T. 36. № 12. С. 1599–1605.
155. Takaba H. и др. Fezf2 Orchestrates a Thymic Program of Self-Antigen Expression for Immune Tolerance // *Cell.* 2015. T. 163. № 4. С. 975–987.
156. Takaba H., Takayanagi H. The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus // *Trends Immunol.* 2017. T. 38. № 11. С. 805–816.
157. Takada K., Takahama Y. Positive-selection-inducing self-peptides displayed by cortical thymic epithelial cells // *Adv. Immunol.* 2015. T. 125. С. 87–110.
158. Takata H., Takiguchi M. Three memory subsets of human CD8+ T cells differently expressing three cytolytic effector molecules // *J. Immunol.* 2006. T. 177. № 7. С. 4330–4340.
159. Thapa D.R. и др. 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. С. 132.

160. Thomas P.G. и др. Cell-mediated protection in influenza infection // *Emerging Infect. Dis.* 2006. Т. 12. № 1. С. 48–54.
161. Thome J.J.C. и др. Spatial map of human T cell compartmentalization and maintenance over decades of life // *Cell*. 2014. Т. 159. № 4. С. 814–828.
162. Thome J.J.C. и др. Longterm maintenance of human naive T cells through in situ homeostasis in lymphoid tissue sites // *Sci Immunol.* 2016. Т. 1. № 6.
163. Tickotsky N. и др. McPAS-TCR: a manually curated catalogue of pathology-associated T cell receptor sequences // *Bioinformatics.* 2017. Т. 33. № 18. С. 2924–2929.
164. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity // *Nature.* 1983. Т. 302. № 5909. С. 575–581.
165. Townsend A.R. и др. The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides // *Cell*. 1986. Т. 44. № 6. С. 959–968.
166. Truong K.-L. и др. Killer-like receptors and GPR56 progressive expression defines cytokine production of human CD4+ memory T cells // *Nat Commun.* 2019. Т. 10. № 1. С. 2263.
167. Tu W., Rao S. Mechanisms Underlying T Cell Immunosenescence: Aging and Cytomegalovirus Infection // *Front Microbiol.* 2016. Т. 7. С. 2111.
168. Turchaninova M.A. и др. High-quality full-length immunoglobulin profiling with unique molecular barcoding // *Nat Protoc.* 2016. Т. 11. № 9. С. 1599–1616.
169. Wang P. и др. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach // *PLoS Computational Biology.* 2008. Т. 4. № 4.
170. Watson A., Klimstra W. T Cell-Mediated Immunity towards Yellow Fever Virus and Useful Animal Models // *Viruses.* 2017. Т. 9. № 4. С. 77.
171. Wieten R.W. и др. A Single 17D Yellow Fever Vaccination Provides Lifelong Immunity; Characterization of Yellow-Fever-Specific Neutralizing Antibody and T-Cell Responses after Vaccination // *PLoS ONE.* 2016. Т. 11. № 3. С. e0149871.
172. Wong Y.N.S. и др. Urine-derived lymphocytes as a non-invasive measure of the bladder tumor immune microenvironment // *J. Exp. Med.* 2018. Т. 215. № 11. С. 2748–2759.
173. Wrammert J. и др. Human immune memory to yellow fever and smallpox vaccination // *Journal of Clinical Immunology.* 2009. Т. 29. № 2. С. 151–157.
174. Xiao Z., Mescher M.F., Jameson S.C. Detuning CD8 T cells: down-regulation of CD8 expression, tetramer binding, and response during CTL activation // *J. Exp. Med.* 2007. Т. 204. № 11. С. 2667–2677.
175. Zhang S.-Q. и др. High-throughput determination of the antigen specificities of T cell receptors in single cells // *Nat Biotechnol.* 2018. Т. 36. № 12. С. 1156–1159.
176. Zhou X. и др. Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1 // *Immunity.* 2010. Т. 33. № 2. С. 229–240.
177. Zhu Y.Y. и др. Reverse Transcriptase Template Switching: A SMARTTM Approach for Full-Length cDNA Library Construction // *BioTechniques.* 2001. Т. 30. № 4. С. 892–897.
178. Zinkernagel R.M., Doherty P.C. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis // *Nature.* 1974. Т. 251. № 5475. С. 547–548.
179. Zvyagin I.V. и др. Tracking T-cell immune reconstitution after TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted hematopoietic cells transplantation in children // *Leukemia.* 2017. Т. 31. № 5. С. 1145–1153.

Приложения

ПРИЛОЖЕНИЕ 1

Название праймера	Последовательность	Количество в смеси (пкмоль)
Смесь праймеров для синтеза		
HLA-I synt new	AGGCCAGCAAYRATGCCCA	10
HLA-II synt new11	CTTGYTCTGGGCAGATTCAGA	5
HLA-II synt new12	CTTGCTCTGTGCAGATTCAGA	5
HLA-C synt-ins	GACAGCTAGGACARCCAGGA	10
HLA-C synt-mm	CAGAGCCCTGGGCACTGTTG	10
Смесь №1 для первой ПЦР		
HLA-I_A1-next_For	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCCTGACCSAGACCTG	3
HLA-I_A1-next_Rev31	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGGCCGCTCCMACTTG	2
HLA-I_A1-next_Rev32	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGGCCGCTCTCCCACTTG	1
HLA-I_A1-next_Rev33	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACCGCTCCCACTTG	1
HLAI_A1-inv_For	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCCTGACCSAGACCTG	3
HLA-I_A1-inv_Rev31	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGGCCGCTCCMACTTG	2
HLA-I_A1-inv_Rev32	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGGCCGCTCTCCCACTTG	1
HLA-I_A1-inv_Rev33	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGACCGCTCCCACTTG	1
Смесь №2 для первой ПЦР		
HLA-I_A2 next For	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGACGGCAARGATTAC	3
HLA-I_A2 Rev good	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGYGGTGGRCTGGGAAGA	3
HLA-I_A2-inv_For	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGACGGCAARGATTAC	3
HLA-I_A2-inv_Rev good	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGYGGTGGRCTGGGAAGA	3
Смесь №3 для первой ПЦР		
DRB_A1-next_For	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTGAGCTCCCSACTGG	3
DQB_A1-next_For	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGKCTTTGCGGATCCC	3
HLAII_A1-next_Rev_g1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGYCAGCAGGTTGTGGTG	3

HLAII_A1-next_Rev_g2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCAGSAGGTTRTGGTG	3
DRB_A1-inv_For	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTGAGCTCCCSACTGG	3
DQB_A1-inv_For	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGKCTTTGCGGATCCC	3
HLAII_A1-inv_Rev_g1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGYCAGCAGGTTGTGGTG	3
HLAII_A1-inv_Rev_g2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCAGSAGGTTRTGGTG	3
Смесь №4 для первой ПЦР		
HLAII_A2 next For_good	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGAAAYAGCCAGAAGGA	3
HLA-II_A2 next_Rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCACKTGGCAGGTGTA	2
HLA-II_A2-next_Rev_ad	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCACTTGGCAAGTGTA	1
HLAII_A2-inv_For_good	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGAAAYAGCCAGAAGGA	3
HLA-II_A2-inv_Rev	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCACKTGGCAGGTGTA	2
HLA-II_A2-inv_Rev_ad	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCACTTGGCAAGTGTA	1
Смесь №5 для первой ПЦР		
H1-A1-alt_For_long	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCYCACTCCATGAGGTATTTTC	3
H1-A1-alt_For2_long	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCCCACTCCATGAAGTATTTTC	3
H1-A1-alt_Rev11	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAGCSACTCCACGCAC	3
H1-A1-alt_Rev12	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAGCCCGTCCACGCA	3
H1-A1-alt-inv_For_long	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCYCACTCCATGAGGTATTTTC	3
H1-A1-alt-inv_For2_long	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCCCACTCCATGAAGTATTTTC	3
H1-A1-alt-inv_Rev11	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGCSACTCCACGCAC	3
H1-A1-alt-inv_Rev12	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGCCCGTCCACGCAC	3
Смесь №6 для первой ПЦР		
H1-A2-alt_For11	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGCAARGATTACATCGCC	3
H1-A2-alt_Rev_short	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCAGGGTGAGGGGCT	3
H1-A2-alt_Rev2_short	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCAGGGTGACAGGGCT	3
H1-A2-alt-inv_For11	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGCAARGATTACATCGCC	3
H1-A2-alt-inv_Rev_short	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCAGGGTGAGGGGCT	3
H1-A2-alt-inv_Rev2_short	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCAGGGTGACAGGGCT	3
Смесь №7 для первой ПЦР		

H2-A1-alt-R For1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGACAGTGACACTGATGG	1.5
H2-A1-alt-R For2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGACAGTGACATTGACGG	1.5
H2-A1-alt-R Rev_corr	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAGYCTTCTCTTCCTGGC	3
H2-A1-alt-Q For	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGAGGGCAGAGACYCTCC	3
H2-A1-alt-Q Rev_corr	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTCCAGTCACCR TTCCTA	3
H2-A1-alt-R-inv For1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGACAGTGACACTGATGG	1.5
H2-A1-alt-R-inv For2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGACAGTGACATTGACGG	1.5
H2-A1-alt-R-inv Rev_corr	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAGYCTTCTCTTCCTGGC	3
H2-A1-alt-Q-inv For	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGAGGGCAGAGACYCTCC	3
H2-A1-alt-Q-inv Rev_corr	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTCCAGTCACCR TTCCTA	3
Смесь №8 для первой ПЦР		
H2_A2-alt-Q_For	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACCATCTCCCCATCCAG	3
H2_A2-alt-R_For2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAGAGCTTCACRGTGCAG	3
H2_A2-alt-Q_Rev_corr	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGYTCTGGGCAGATTCAG	3
H2_A2-alt-R_Rev3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGCTCTGTGCAGATTCAG	3
H2_A2-alt-inv-Q_For	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACCATCTCCCCATCCAG	3
H2_A2-alt-inv-R_For2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAGAGCTTCACRGTGCAG	3
H2_A2-alt-inv-Q_Rev_corr	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGYTCTGGGCAGATTCAG	3
H2_A2-alt-inv-R_Rev3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGCTCTGTGCAGATTCAG	3

ПРИЛОЖЕНИЕ 2

Донор	Вакцинация	День после вакцинации	Идентификатор образца	Число клеток	Фракция клеток	Кол-во ридов	Кол-во UMI	Кол-во клонотипов	Метод
M1	1	0	M1_0_F1	~4 млн	PBMC	2992472	738123	299183	TCR α
M1	1	0	M1_0_F1	~4 млн	PBMC	3548289	974827	398473	TCR β
M1	1	0	M1_0_F2	~4 млн	PBMC	2657325	659518	275583	TCR α
M1	1	0	M1_0_F2	~4 млн	PBMC	3846212	801737	341717	TCR β
M1	1	0	M1_0_CD4	~1 млн	CD4+	2878566	206093	127678	TCR α
M1	1	0	M1_0_CD4	~1 млн	CD4+	2554826	279602	170231	TCR β
M1	1	0	M1_0_CD8	~1 млн	CD8+	2993176	187645	48697	TCR α
M1	1	0	M1_0_CD8	~1 млн	CD8+	1913256	215601	55584	TCR β
M1	1	0	M1_0_P4	~20 500	CD3+CD45RA-CCR7+	1592730	11410	1769	TCR α
M1	1	0	M1_0_P4	~20 500	CD3+CD45RA-CCR7+	1163888	8116	1705	TCR β
M1	1	0	M1_0_P5	~400 000	CD3+CD45RA-CCR7-	768866	85394	28318	TCR α
M1	1	0	M1_0_P5	~400 000	CD3+CD45RA-CCR7-	1016413	94020	30722	TCR β
M1	1	0	M1_0_P6	~380 000	CD3+CD45RA+CCR7-	1245433	51863	3725	TCR α
M1	1	0	M1_0_P6	~380 000	CD3+CD45RA+CCR7-	1088093	63623	4048	TCR β
M1	1	0	M1_0_P7	~2100	CD3+CD45RA+CCR7+CD95+	1062	NA	176	RNAseq
M1	1	0	M1_0_P7	~2100	CD3+CD45RA+CCR7+CD95+	1787	NA	201	RNAseq
M1	1	5	M1_5_F1	~4 млн	PBMC	3113602	1383433	515432	TCR α
M1	1	5	M1_5_F1	~4 млн	PBMC	4892587	1839579	693777	TCR β
M1	1	5	M1_5_F2	~4 млн	PBMC	3034747	1402560	523967	TCR α
M1	1	5	M1_5_F2	~4 млн	PBMC	5550967	1971752	727225	TCR β
M1	1	5	M1_5_CD4	~1 млн	CD4+	2979171	248235	144669	TCR α
M1	1	5	M1_5_CD4	~1 млн	CD4+	2536633	274881	160973	TCR β
M1	1	5	M1_5_CD8	~1 млн	CD8+	3692483	224602	62351	TCR α
M1	1	5	M1_5_CD8	~1 млн	CD8+	1949798	267131	73583	TCR β
M1	1	10	M1_10_F1	~4 млн	PBMC	3345705	1177390	463346	TCR α
M1	1	10	M1_10_F1	~4 млн	PBMC	4208163	1413473	592995	TCR β
M1	1	10	M1_10_F2	~4 млн	PBMC	3227599	1151288	457836	TCR α
M1	1	10	M1_10_F2	~4 млн	PBMC	3813734	1266471	547018	TCR β
M1	1	10	M1_10_CD4	~1 млн	CD4+	3575011	144548	97400	TCR α
M1	1	10	M1_10_CD4	~1 млн	CD4+	2381451	174300	117311	TCR β
M1	1	10	M1_10_CD8	~1 млн	CD8+	2472223	189053	59308	TCR α
M1	1	10	M1_10_CD8	~1 млн	CD8+	2318788	65413	26948	TCR β
M1	1	15	M1_15_F1	~4 млн	PBMC	2904545	602627	280118	TCR α
M1	1	15	M1_15_F1	~4 млн	PBMC	3367253	728646	356520	TCR β
M1	1	15	M1_15_F2	~4 млн	PBMC	3169461	508715	233352	TCR α
M1	1	15	M1_15_F2	~4 млн	PBMC	3523427	641077	304230	TCR β
M1	1	15	M1_15_CD4	~1 млн	CD4+	3827195	64920	50622	TCR α
M1	1	15	M1_15_CD4	~1 млн	CD4+	1900690	77222	60692	TCR β
M1	1	15	M1_15_CD8	~1 млн	CD8+	2782838	94989	36843	TCR α
M1	1	15	M1_15_CD8	~1 млн	CD8+	1848246	113204	43294	TCR β
M1	1	15	M1_15_P3	~300 000	CD3+CD45RA+CCR7+	1249283	27094	24787	TCR α
M1	1	15	M1_15_P3	~300 000	CD3+CD45RA+CCR7+	873036	32768	29786	TCR β
M1	1	15	M1_15_P4	~70 000	CD3+CD45RA-CCR7+	1093009	9583	7579	TCR α
M1	1	15	M1_15_P4	~70 000	CD3+CD45RA-CCR7+	785905	11695	8757	TCR β
M1	1	15	M1_15_P5	~500 000	CD3+CD45RA-CCR7-	1167712	51244	25343	TCR α
M1	1	15	M1_15_P5	~500 000	CD3+CD45RA-CCR7-	1036067	53677	26598	TCR β
M1	1	15	M1_15_P6	~340 000	CD3+CD45RA+CCR7-	723995	22341	4101	TCR α
M1	1	15	M1_15_P6	~340 000	CD3+CD45RA+CCR7-	975528	30025	4767	TCR β
M1	1	15	M1_15_Tet+	~1100	CD3+CD8+A02-NS4B+	2661	NA	545	RNAseq
M1	1	15	M1_15_Tet+	~1100	CD3+CD8+A02-NS4B+	2501	NA	512	RNAseq
M1	1	15	M1_15_Tet-	~500 000	CD3+CD8+A02-NS4B-	936913	170963	85508	TCR α
M1	1	15	M1_15_Tet-	~500 000	CD3+CD8+A02-NS4B-	967150	196334	96071	TCR β
M1	1	21	M1_21_F1	~4 млн	PBMC	3104512	1377607	485814	TCR α
M1	1	21	M1_21_F1	~4 млн	PBMC	3944530	1721207	620159	TCR β

M1	1	21	M1_21_F2	~4 млн	PBMC	2874530	1559345	552462	TCR α
M1	1	21	M1_21_F2	~4 млн	PBMC	3831990	1846524	684885	TCR β
M1	1	21	M1_21_Tet+	~12 300	CD3+CD8+A02-NS4B+	1094764	43185	2113	TCR α
M1	1	21	M1_21_Tet+	~12 300	CD3+CD8+A02-NS4B+	921429	25621	1497	TCR β
M1	1	21	M1_21_Tet-	~500 000	CD3+CD8+A02-NS4B-	647805	201721	80977	TCR α
M1	1	21	M1_21_Tet-	~500 000	CD3+CD8+A02-NS4B-	898537	242137	95021	TCR β
M1	1	45	M1_45_F1	~4 млн	PBMC	3378573	681913	305319	TCR α
M1	1	45	M1_45_F1	~4 млн	PBMC	3786724	754739	359654	TCR β
M1	1	45	M1_45_F2	~4 млн	PBMC	3506852	562084	262692	TCR α
M1	1	45	M1_45_F2	~4 млн	PBMC	3931720	644763	309569	TCR β
M1	1	45	M1_45_CD4	~1 млн	CD4+	3655784	119431	84166	TCR α
M1	1	45	M1_45_CD4	~1 млн	CD4+	2335925	159835	111173	TCR β
M1	1	45	M1_45_CD8	~1 млн	CD8+	2501487	164498	55414	TCR α
M1	1	45	M1_45_CD8	~1 млн	CD8+	2583237	214256	67827	TCR β
M1	1	45	M1_45_P4	~160 000	CD3+CD45RA-CCR7+	1099973	27929	20583	TCR α
M1	1	45	M1_45_P4	~160 000	CD3+CD45RA-CCR7+	1226245	35679	23861	TCR β
M1	1	45	M1_45_P5	~200 000	CD3+CD45RA-CCR7-	995378	43870	19026	TCR α
M1	1	45	M1_45_P5	~200 000	CD3+CD45RA-CCR7-	1213869	51884	20792	TCR β
M1	1	45	M1_45_P6	~250 000	CD3+CD45RA+CCR7-	1887133	37760	3944	TCR α
M1	1	45	M1_45_P6	~250 000	CD3+CD45RA+CCR7-	1161905	47397	4162	TCR β
M1	1	45	M1_45_P7	~1300	CD3+CD45RA+CCR7+CD95+	1529	NA	564	RNAseq
M1	1	45	M1_45_P7	~1300	CD3+CD45RA+CCR7+CD95+	2422	NA	698	RNAseq
M1	1	45	M1_45_Tet+	~16 500	CD3+CD8+A02-NS4B+	1036620	8950	1099	TCR α
M1	1	45	M1_45_Tet+	~16 500	CD3+CD8+A02-NS4B+	1047645	8757	870	TCR β
M1	1	45	M1_45_Tet-	~400 000	CD3+CD8+A02-NS4B-	1313693	101908	44289	TCR α
M1	1	45	M1_45_Tet-	~400 000	CD3+CD8+A02-NS4B-	1021553	121666	49397	TCR β
M1	2	0	M1_v2_pre0_F1	~4 млн	PBMC	6506421	1232441	453820	TCR α
M1	2	0	M1_v2_pre0_F1	~4 млн	PBMC	4417808	1347268	553491	TCR β
M1	2	0	M1_v2_pre0_F2	~4 млн	PBMC	6436252	1271578	461329	TCR α
M1	2	0	M1_v2_pre0_F2	~4 млн	PBMC	7131242	1688366	638223	TCR β
M1	2	0	M1_v2_0_F1	~4 млн	PBMC	7528577	757262	289693	TCR α
M1	2	0	M1_v2_0_F1	~4 млн	PBMC	7267785	785482	315831	TCR β
M1	2	0	M1_v2_0_CD4	~1 млн	CD4+	2719745	448005	234359	TCR α
M1	2	0	M1_v2_0_CD4	~1 млн	CD4+	2868690	586014	293003	TCR β
M1	2	0	M1_v2_0_CD8	~1 млн	CD8+	3074981	557646	122548	TCR α
M1	2	0	M1_v2_0_CD8	~1 млн	CD8+	2656527	668646	144021	TCR β
M1	2	0	M1_v2_0_P4	~80 000	CD3+CD45RA+CCR7+	1903046	19165	11427	TCR α
M1	2	0	M1_v2_0_P4	~80 000	CD3+CD45RA+CCR7+	2897592	25833	13201	TCR β
M1	2	0	M1_v2_0_P5	~800 000	CD3+CD45RA-CCR7+	1309379	64375	24264	TCR α
M1	2	0	M1_v2_0_P5	~800 000	CD3+CD45RA-CCR7+	1558672	69034	24648	TCR β
M1	2	0	M1_v2_0_P6	~620 000	CD3+CD45RA-CCR7-	1030440	75035	36291	TCR α
M1	2	0	M1_v2_0_P6	~620 000	CD3+CD45RA-CCR7-	1991404	103245	49854	TCR β
M1	2	0	M1_v2_0_P7	~14 000	CD3+CD45RA+CCR7-	1586638	2703	580	TCR α
M1	2	0	M1_v2_0_P7	~14 000	CD3+CD45RA+CCR7-	1797272	3253	658	TCR β
M1	2	0	M1_v2_0_Tet+	~9 000	CD3+CD8+A02-NS4B+	86909228	24193	164	$\alpha\beta$ TCR
M1	2	0	M1_v2_0_Tet+	~9 000	CD3+CD8+A02-NS4B+	145621254	40816	164	$\alpha\beta$ TCR
M1	2	5	M1_v2_5_F1	~4 млн	PBMC	6744286	929158	324544	TCR α
M1	2	5	M1_v2_5_F1	~4 млн	PBMC	6537014	984742	370791	TCR β
M1	2	5	M1_v2_5_F2	~4 млн	PBMC	6504811	963654	322595	TCR α
M1	2	5	M1_v2_5_F2	~4 млн	PBMC	6371333	1055201	377589	TCR β
M1	2	5	M1_v2_5_CD4	~1 млн	CD4+	2523995	557137	281044	TCR α
M1	2	5	M1_v2_5_CD4	~1 млн	CD4+	2562653	682976	345695	TCR β
M1	2	5	M1_v2_5_CD8	~1 млн	CD8+	2543922	574861	127203	TCR α
M1	2	5	M1_v2_5_CD8	~1 млн	CD8+	1983126	646030	142994	TCR β
M1	2	10	M1_v2_10_F1	~4 млн	PBMC	6774128	1284754	460459	TCR α
M1	2	10	M1_v2_10_F1	~4 млн	PBMC	6652475	1479105	571330	TCR β
M1	2	10	M1_v2_10_F2	~4 млн	PBMC	5932308	1282652	459955	TCR α
M1	2	10	M1_v2_10_F2	~4 млн	PBMC	4946870	1457800	569893	TCR β
M1	2	10	M1_v2_10_CD4	~1 млн	CD4+	2718097	364247	204339	TCR α
M1	2	10	M1_v2_10_CD4	~1 млн	CD4+	3210904	416576	237739	TCR β
M1	2	10	M1_v2_10_CD8	~1 млн	CD8+	4055164	372108	99613	TCR α
M1	2	10	M1_v2_10_CD8	~1 млн	CD8+	2204834	421161	106734	TCR β
M1	2	15	M1_v2_15_F1	~4 млн	PBMC	8188326	786419	326750	TCR α

M1	2	15	M1_v2_15_F1	~4 млн	PBMC	6446855	803300	357771	TCR β
M1	2	15	M1_v2_15_F2	~4 млн	PBMC	8405035	506132	235288	TCR α
M1	2	15	M1_v2_15_F2	~4 млн	PBMC	8304820	504669	248318	TCR β
M1	2	15	M1_v2_15_CD4	~1 млн	CD4+	2573616	741552	348243	TCR α
M1	2	15	M1_v2_15_CD4	~1 млн	CD4+	2521963	867586	418114	TCR β
M1	2	15	M1_v2_15_CD8	~1 млн	CD8+	2514378	675027	169158	TCR α
M1	2	15	M1_v2_15_CD8	~1 млн	CD8+	2953112	840008	205557	TCR β
M1	2	45	M1_v2_45_F1	~4 млн	PBMC	5222312	1187313	438475	TCR α
M1	2	45	M1_v2_45_F1	~4 млн	PBMC	6131174	1339208	533758	TCR β
M1	2	45	M1_v2_45_F2	~4 млн	PBMC	6082676	1363912	467431	TCR α
M1	2	45	M1_v2_45_F2	~4 млн	PBMC	7421728	1631287	591344	TCR β
M1	2	45	M1_v2_45_CD4	~1 млн	CD4+	2087060	726025	327965	TCR α
M1	2	45	M1_v2_45_CD4	~1 млн	CD4+	2548972	917140	409914	TCR β
M1	2	45	M1_v2_45_CD8	~1 млн	CD8+	2672716	701110	159731	TCR α
M1	2	45	M1_v2_45_CD8	~1 млн	CD8+	2959858	874612	195704	TCR β
P30	2	0	P30_0_F1	~4 млн	PBMC	3136044	1023608	482671	TCR α
P30	2	0	P30_0_F1	~4 млн	PBMC	3548289	1240401	657089	TCR β
P30	2	0	P30_0_F2	~4 млн	PBMC	3022765	996770	472542	TCR α
P30	2	0	P30_0_F2	~4 млн	PBMC	3846212	1162816	621945	TCR β
P30	2	0	P30_0_CD4	~1 млн	CD4+	3484442	282941	197366	TCR α
P30	2	0	P30_0_CD4	~1 млн	CD4+	2587737	321819	231430	TCR β
P30	2	0	P30_0_CD8	~1 млн	CD8+	2992761	208364	60913	TCR α
P30	2	0	P30_0_CD8	~1 млн	CD8+	1596710	232850	73602	TCR β
P30	2	0	P30_0_P4	~38 000	CD3+CD45RA-CCR7+	550338	12508	9654	TCR α
P30	2	0	P30_0_P4	~38 000	CD3+CD45RA-CCR7+	913400	15987	10717	TCR β
P30	2	0	P30_0_P5	~230 000	CD3+CD45RA-CCR7-	730594	61701	24865	TCR α
P30	2	0	P30_0_P5	~230 000	CD3+CD45RA-CCR7-	812266	85869	28348	TCR β
P30	2	0	P30_0_P6	~110 000	CD3+CD45RA+CCR7-	1266521	40591	2713	TCR α
P30	2	0	P30_0_P6	~110 000	CD3+CD45RA+CCR7-	1082579	36826	3270	TCR β
P30	2	0	P30_0_P7	~230	CD3+CD45RA+CCR7+CD95+	190	NA	18	RNAseq
P30	2	0	P30_0_P7	~230	CD3+CD45RA+CCR7+CD95+	204	NA	16	RNAseq
P30	2	5	P30_5_F1	~4 млн	PBMC	3311021	335139	199884	TCR α
P30	2	5	P30_5_F1	~4 млн	PBMC	5054740	436731	282653	TCR β
P30	2	5	P30_5_F2	~4 млн	PBMC	3002899	438316	248514	TCR α
P30	2	5	P30_5_F2	~4 млн	PBMC	4290357	565288	353105	TCR β
P30	2	5	P30_5_CD4	~1 млн	CD4+	3332866	135520	107214	TCR α
P30	2	5	P30_5_CD4	~1 млн	CD4+	2420198	161282	129741	TCR β
P30	2	5	P30_5_CD8	~1 млн	CD8+	3174925	67443	23324	TCR α
P30	2	5	P30_5_CD8	~1 млн	CD8+	2464740	74862	27824	TCR β
P30	2	10	P30_10_F1	~4 млн	PBMC	3322691	617756	318494	TCR α
P30	2	10	P30_10_F1	~4 млн	PBMC	4342257	819542	458455	TCR β
P30	2	10	P30_10_F2	~4 млн	PBMC	3289807	601901	315246	TCR α
P30	2	10	P30_10_F2	~4 млн	PBMC	4213449	763254	443261	TCR β
P30	2	10	P30_10_CD4	~1 млн	CD4+	3053833	126151	98263	TCR α
P30	2	10	P30_10_CD4	~1 млн	CD4+	2322812	171972	133664	TCR β
P30	2	10	P30_10_CD8	~1 млн	CD8+	3651835	57170	20895	TCR α
P30	2	10	P30_10_CD8	~1 млн	CD8+	2153599	65413	26948	TCR β
P30	2	15	P30_15_F1	~4 млн	PBMC	3132011	1096848	544537	TCR α
P30	2	15	P30_15_F1	~4 млн	PBMC	3735828	1231032	722016	TCR β
P30	2	15	P30_15_F2	~4 млн	PBMC	3452967	1103225	554220	TCR α
P30	2	15	P30_15_F2	~4 млн	PBMC	4066075	1184939	707003	TCR β
P30	2	15	P30_15_CD4	~1 млн	CD4+	3475010	246539	177425	TCR α
P30	2	15	P30_15_CD4	~1 млн	CD4+	2495570	334148	243960	TCR β
P30	2	15	P30_15_CD8	~1 млн	CD8+	3553322	134181	47083	TCR α
P30	2	15	P30_15_CD8	~1 млн	CD8+	2490734	153222	59650	TCR β
P30	2	15	P30_15_P3	~90 000	CD3+CD45RA+CCR7+	1059883	13314	11460	TCR α
P30	2	15	P30_15_P3	~90 000	CD3+CD45RA+CCR7+	1039369	17013	14212	TCR β
P30	2	15	P30_15_P4	~20 000	CD3+CD45RA-CCR7+	1122837	5064	3690	TCR α
P30	2	15	P30_15_P4	~20 000	CD3+CD45RA-CCR7+	999292	6268	4308	TCR β
P30	2	15	P30_15_P5	~200 000	CD3+CD45RA-CCR7-	1115797	32975	20007	TCR α
P30	2	15	P30_15_P5	~200 000	CD3+CD45RA-CCR7-	975852	43633	23656	TCR β
P30	2	15	P30_15_P6	~65 000	CD3+CD45RA+CCR7-	1511746	14996	3404	TCR α
P30	2	15	P30_15_P6	~65 000	CD3+CD45RA+CCR7-	842981	13907	4308	TCR β

P30	2	45	P30_45_F1	~4 млн	PBMC	3281375	912940	534918	TCR α
P30	2	45	P30_45_F1	~4 млн	PBMC	4025378	1226039	799632	TCR β
P30	2	45	P30_45_F2	~4 млн	PBMC	3448739	906942	509397	TCR α
P30	2	45	P30_45_F2	~4 млн	PBMC	3734564	1210279	769020	TCR β
P30	2	45	P30_45_CD4	~1 млн	CD4+	3413865	254275	191135	TCR α
P30	2	45	P30_45_CD4	~1 млн	CD4+	1578907	355026	277859	TCR β
P30	2	45	P30_45_CD8	~1 млн	CD8+	3506007	175268	82215	TCR α
P30	2	45	P30_45_CD8	~1 млн	CD8+	2510759	213971	108724	TCR β
P30	2	45	P30_45_P4	~85 000	CD3+CD45RA-CCR7+	1180568	18188	14106	TCR α
P30	2	45	P30_45_P4	~85 000	CD3+CD45RA-CCR7+	1007513	26362	18487	TCR β
P30	2	45	P30_45_P5	~400 000	CD3+CD45RA-CCR7-	1334288	67716	37200	TCR α
P30	2	45	P30_45_P5	~400 000	CD3+CD45RA-CCR7-	773859	87043	43399	TCR β
P30	2	45	P30_45_P6	~250 000	CD3+CD45RA+CCR7-	1392325	28025	8226	TCR α
P30	2	45	P30_45_P6	~250 000	CD3+CD45RA+CCR7-	1011062	28488	11404	TCR β
P30	2	45	P30_45_P7	~2500	CD3+CD45RA+CCR7+CD95+	1935	NA	1016	RNAseq
P30	2	45	P30_45_P7	~2500	CD3+CD45RA+CCR7+CD95+	3865	NA	1499	RNAseq
P30	2	45	P30_45_Tet+	~180	CD3+CD8+A02-NS4B+	1424	NA	180	RNAseq
P30	2	45	P30_45_Tet+	~180	CD3+CD8+A02-NS4B+	2463	NA	229	RNAseq
P30	2	45	P30_45_Tet-	~400 000	CD3+CD8+A02-NS4B-	1346384	54284	32614	TCR α
P30	2	45	P30_45_Tet-	~400 000	CD3+CD8+A02-NS4B-	944961	66305	41704	TCR β