

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

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в лаборатории сравнительной и функциональной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

**Научный руководитель:**

**Мамедов Ильгар Зиядинович**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории сравнительной и функциональной геномики ИБХ РАН

**Официальные оппоненты:**

**Купраш Дмитрий Владимирович**, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН; главный научный сотрудник Лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук

**Ефимов Григорий Александрович**, кандидат биологических наук, заведующий Лабораторией трансплантационной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения Национального медицинского исследовательского центра гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России

Защита диссертации состоится «27» мая 2020 года в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru).

Автореферат разослан «24» апреля 2020 года.

**Учёный секретарь диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук**

**В.А. Олейников**



## Общая характеристика работы

### Актуальность темы исследования

Т-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 высокоаффинных В-клеток. Специфичность Т-клеток обеспечивается расположенными на их поверхности молекулами Т-клеточного рецептора (TCR, T cell receptor), состоящими из двух цепей. Гены  $\alpha$  и  $\beta$ -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 Т-клеток, которые потенциально могут распознать любой антиген.

Иммунный ответ на антиген – это комбинация нескольких процессов: клональная экспансия антиген-распознающих Т-клеток, дифференцировка наивных Т-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 одновременно следить за миллионами отдельных клонов Т-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 Т-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 Т-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 виремия, 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 $\alpha$  и TCR $\beta$  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 $\alpha$  и TCR $\beta$ , специфичных к иммунодоминантному эпитопу NS4B<sub>214-222</sub> вируса желтой лихорадки.

### **Научная новизна**

В этой работе использовано высокопроизводительное секвенирование репертуаров  $\alpha$  и  $\beta$ -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 $\alpha$  и TCR $\beta$  репертуаров показал высокую воспроизводимость в репертуарах  $\alpha$  и  $\beta$ -цепей TCR, что позволило разработать оригинальный биоинформатический алгоритм для спаривания  $\alpha$  и  $\beta$ -цепей TCR на основе схожести клональных траекторий.

Впервые с помощью высокопроизводительного секвенирования репертуаров TCR клеток памяти была показана смена фенотипа клонов цитотоксических Т-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  $\alpha$  и  $\beta$ -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 NS4B<sub>214-222</sub>, 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.

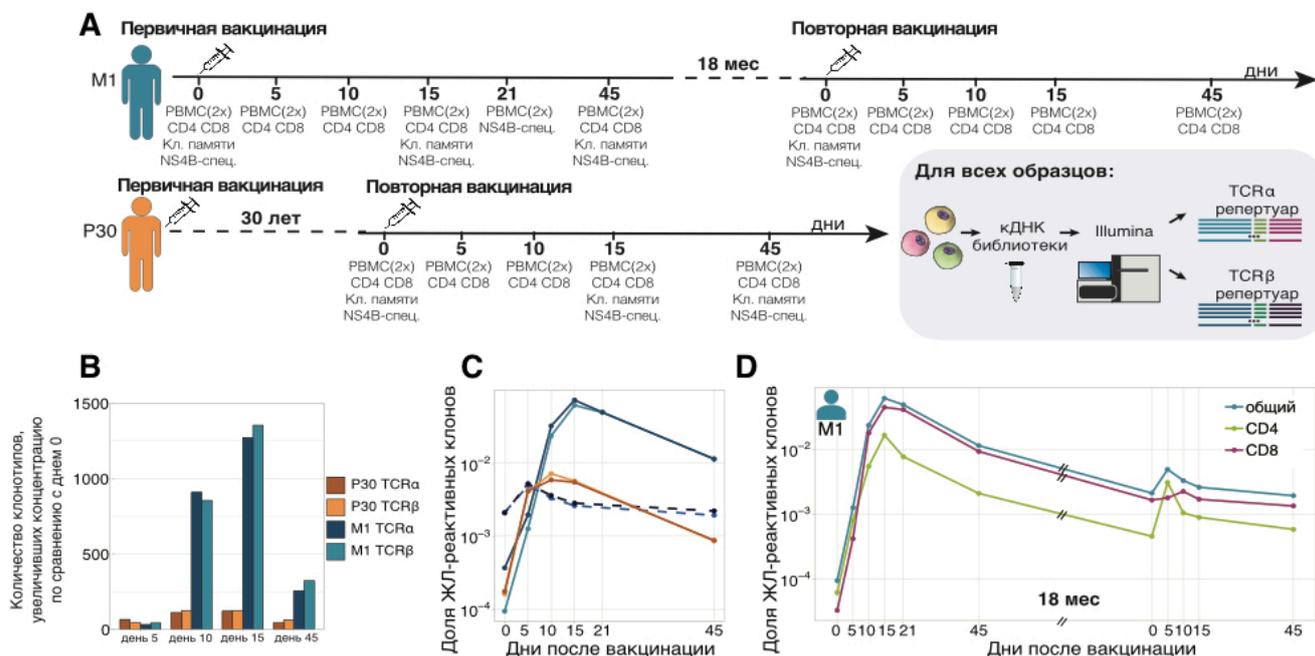
По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, входящих в базы данных Scopus и Web of Science.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация изложена на 112 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка использованной литературы, включающего 179 ссылок и двух приложений. Диссертационная работа содержит 40 рисунков и 2 таблицы.

## Содержание работы

### 1. Создание коллекции образцов и секвенирование библиотек кДНК TCR



**Рис. 1.** **А.** Общая схема эксперимента. Кровь от доноров M1 и P30 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  $\alpha$  и  $\beta$ -цепей TCR. Библиотеки были отсеквенированы на платформе Illumina с последующей реконструкцией TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  репертуаров с помощью специализированного программного обеспечения. **В.** Количество  $\alpha$  и  $\beta$  TCR клонов в различных временных точках после вакцинации от желтой лихорадки, значимо увеличивших свою концентрацию по сравнению с точкой до вакцинации, для доноров M1 и P30. **С.** Доля репертуара (в логарифмическом масштабе), занимаемая ЖЛ-реактивными TCR  $\alpha$  и  $\beta$  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). **Д.** Доля репертуара (в логарифмическом масштабе), занимаемая ЖЛ-реактивными CD4 и CD8 TCR $\beta$  клонотипами, в различных временных точках до и после первичной и вторичной вакцинации донора M1.

Для изучения Т-клеточного иммунного ответа на вакцинацию от желтой лихорадки была собрана коллекция образцов периферической крови двух здоровых доноров (Рисунок 1А). Донор P30 (мужчина, 39 лет) был впервые вакцинирован от ЖЛ более 30 лет назад после чего не пребывал в зонах распространения вируса. Донор M1 (мужчина, 27 лет) ранее не прививался от ЖЛ и в ходе эксперимента был вакцинирован дважды с перерывом в 18 месяцев. HLA генотипы доноров были определены при помощи оригинальной системы HLA-типирования на основе высокопроизводительного секвенирования библиотек кДНК

генов HLA I и II классов (Таблица 1). 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 NS4B<sub>214-222</sub> вируса ЖЛ. Из всех полученных образцов была выделена РНК и с помощью оригинальной системы пробоподготовки получены библиотеки TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  репертуаров. Кроме того, были отсекуены 3500 единичных клеток, специфичных к NS4B<sub>214-222</sub> 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.

**Таблица 1.** 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

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.

## 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. Для того, чтобы выявить такие клоны Т-клеток в отсекуенных репертуарах TCR была использована программа *edgeR*, которая обычно используется для выявления дифференциально-экспрессированных генов в транскриптомах. 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 $\alpha$  и 1580 TCR $\beta$  ЖЛ-реактивных клонотипов, которые на пике ответа (день 15) занимают соответственно 7.8% и 6.7% всего репертуара (Рисунок 1B, C). Интересно, что в независимо проанализированных репертуарах  $\alpha$  и  $\beta$ -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  $\beta$ -цепей TCR. В соответствии с ранее опубликованными работами первичный T-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.

### **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 PBMC, добавить информацию о фенотипе. Оказалось, что в ответ на вторичную вакцинацию донора M1 CD4 ЖЛ-реактивные клоны отвечают быстрее и сильнее, чем CD8 (Рисунок 1D). 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.

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.

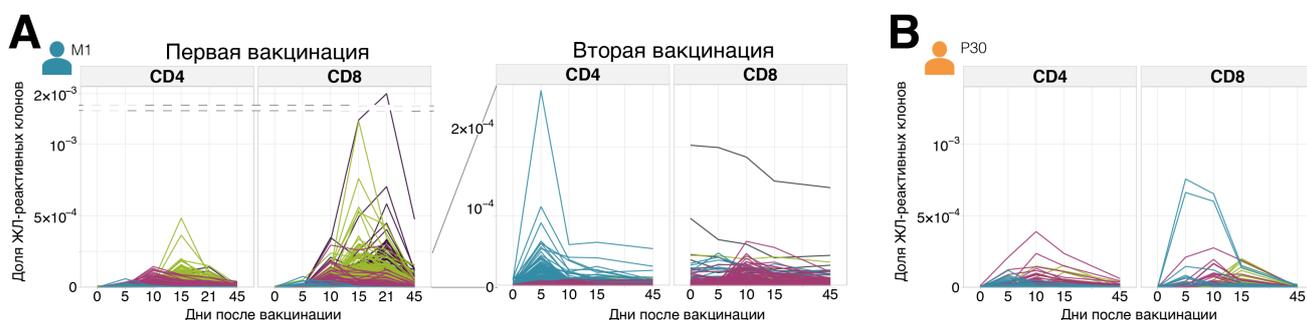
#### **4. Вторичная вакцинация от желтой лихорадки через 30 лет после первичной**

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 $\alpha$  и 204 TCR $\beta$  ЖЛ-реактивных клонотипа для этого донора, что значительно ниже, чем для доноров, вакцинированных впервые (Рисунок 1B). 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 1C). 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.

#### **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 2 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-специфичных Т-клеток.

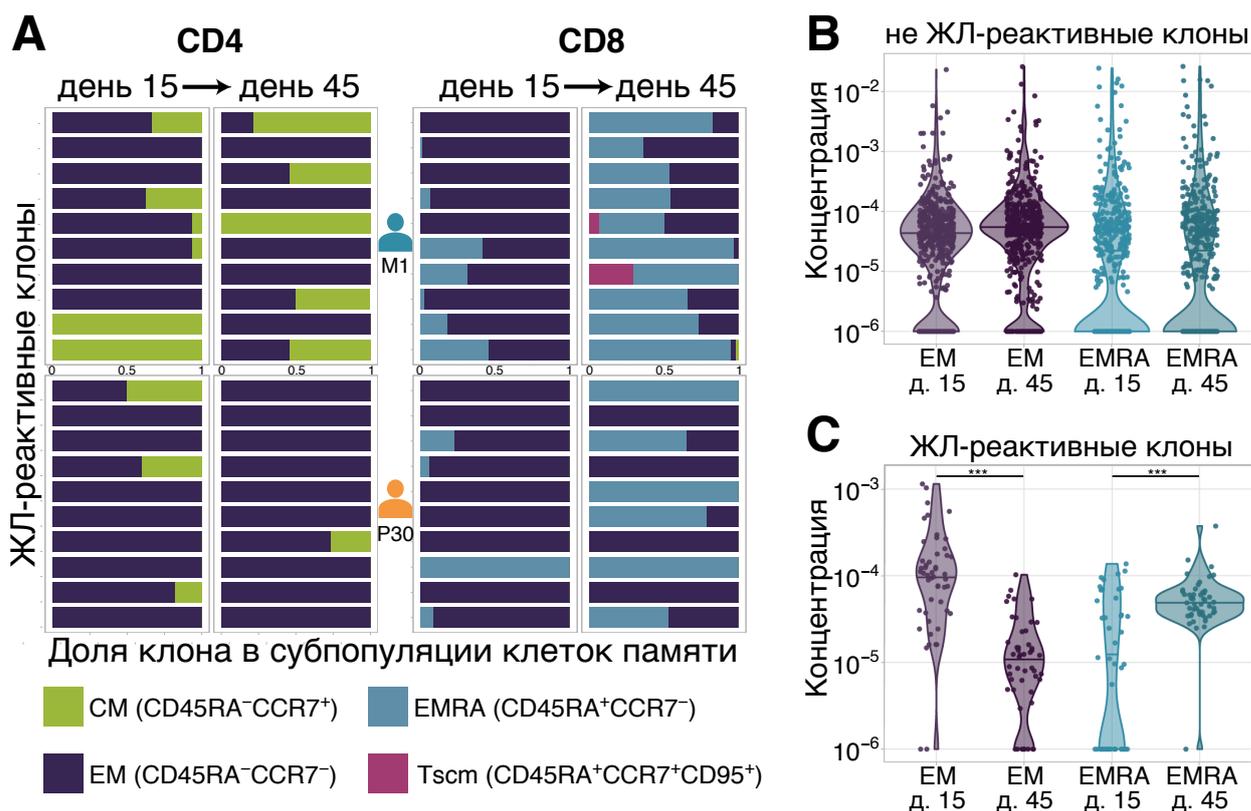


**Рис. 2.** Индивидуальные клональные траектории для всех ЖЛ-реактивных клонов доноров М1 и Р30. Показана доля репертуара, занимаемая каждым ЖЛ-реактивным клоном, в различных точках после вакцинации от вируса желтой лихорадки. Индивидуальные клонотипы значительно увеличивают свою концентрацию после первичной (А, слева) и вторичных вакцинаций от ЖЛ как через 18 месяцев (А, справа), так и через 30 лет (В) 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.

## 6. Изменение клеточного фенотипа в ходе вакцинации от желтой лихорадки

После иммунизации от вируса ЖЛ образуются долгоживущие клетки памяти, которые удастся обнаружить в крови на протяжении многих лет после вакцинации. Чтобы проследить за формированием иммунной памяти были отсекушены репертуары основных субпопуляций клеток памяти: центральная память СМ (CD45RA–CCR7+), эффекторная память ЕМ (CD45RA–CCR7–) и терминально-дифференцированная эффекторная память ЕМРА (CD45RA+CCR7–) на дни 0, 15, 45 и 18 месяцев после первичной вакцинации донора М1 и на дни 0, 15 и 45 после вторичной вакцинации донора Р30. Дополнительно в точках день 0 и 45 была собрана фракция «наивной» Т-клеточной

памяти Tscm (CD45RA+CCR7+CD95+).



**Рис. 3.** Распределение клонотипов между фенотипами Т-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:  $p=1.2 \cdot 10^{-6}$ ).

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 3А). В соответствии с другими исследованиями, CD4 клоны периферической крови представлены в EM и CM, в то время как CD8 клоны имеют EM или EMRA фенотип. Интересно, что большинство CD8 клонов в репертуаре имеют стабильный фенотип между днями 15 и 45 (Рисунок 3В), а ЖЛ-реактивные клоны переходят из EM субпопуляции в EMRA (Рисунок 3С). Такой переход объясняется двумя

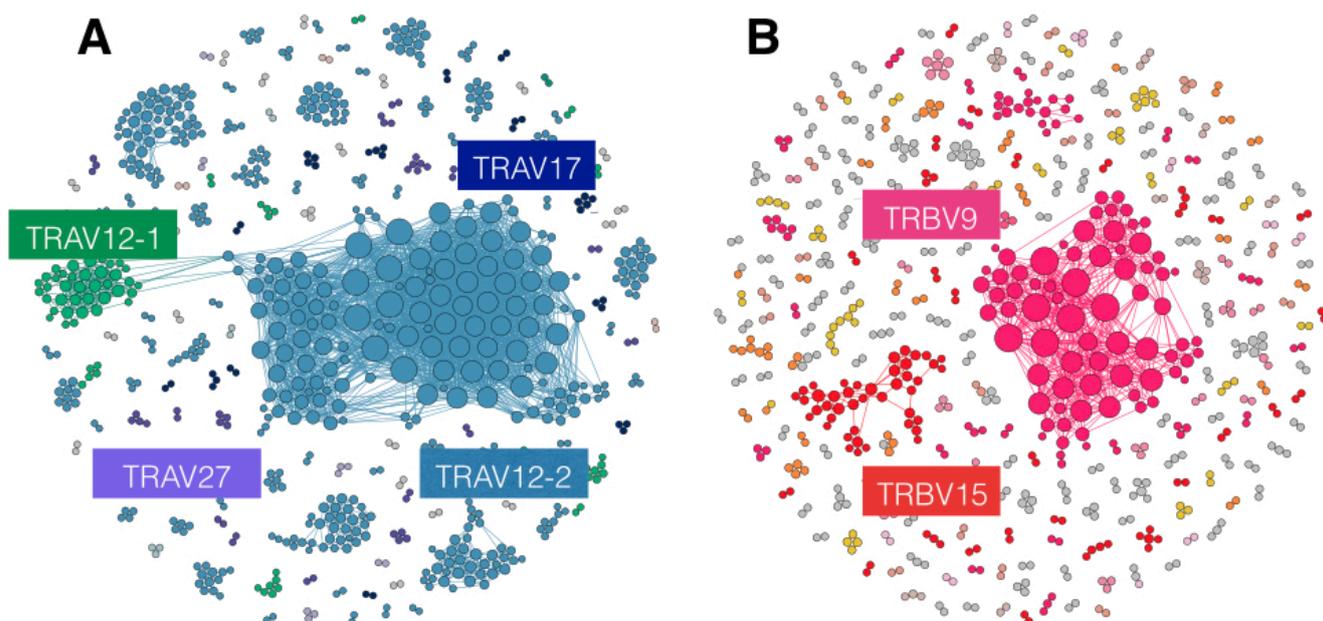
параллельными процессами: постепенным умиранием EM клеток и непосредственно изменением фенотипа клеток, в частности реэкспрессией маркера CD45RA. Через 18 месяцев после первичной вакцинации донора M1 практически все CD8 ЖЛ-реактивные клоны имели EMRA фенотип. Таким образом, было показано, что секвенирование TCR может быть использовано для слежения за изменениями фенотипа отдельных клонов.

## **7. 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. С использованием HLA-A02-мультимера с этим пептидом была получена фракция NS4B<sub>214-222</sub>-специфичных клеток для доноров M1 и P30 в различных временных точках до и после вакцинации. Эти клетки были использованы для секвенирования  $\alpha$  и  $\beta$  репертуаров TCR. Всего было получено около 2100  $\alpha$  и около 2000  $\beta$ -цепей TCR специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса ЖЛ. На данный момент — это самый большой набор последовательностей TCR, специфичных к эпитопу ЖЛ. Имея нуклеотидные последовательности TCR, специфичные к NS4B<sub>214-222</sub>, и нуклеотидные последовательности всех клонов, реагирующих на вакцинацию от ЖЛ (получены с помощью *edgeR*) можно оценить долю иммунодоминантного иммунного ответа. Более 30% NS4B<sub>214-222</sub>-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 клеточного иммунного ответа направлено против данного эпитопа.

## **8. Анализ характеристических аминокислотных последовательностей TCR, специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса желтой лихорадки**

Чтобы понять есть ли какие-то особенности TCR репертуара клонов, специфичных к NS4B<sub>214-222</sub>, которые могли бы объяснить иммунодоминантность этого пептида, мы решили посмотреть на аминокислотные последовательности CDR3  $\alpha$  и  $\beta$ -цепей TCR. Для визуализации разнообразия аминокислотных последовательностей TCR удобно использовать графы, где каждая вершина соответствует аминокислотной последовательности CDR3 клонотипа. Вершины на графе соединены если они отличаются не более чем на одну аминокислотную замену. Такие графы для TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  репертуаров NS4B<sub>214-222</sub>-специфичных клонов представлены на рисунке 4.

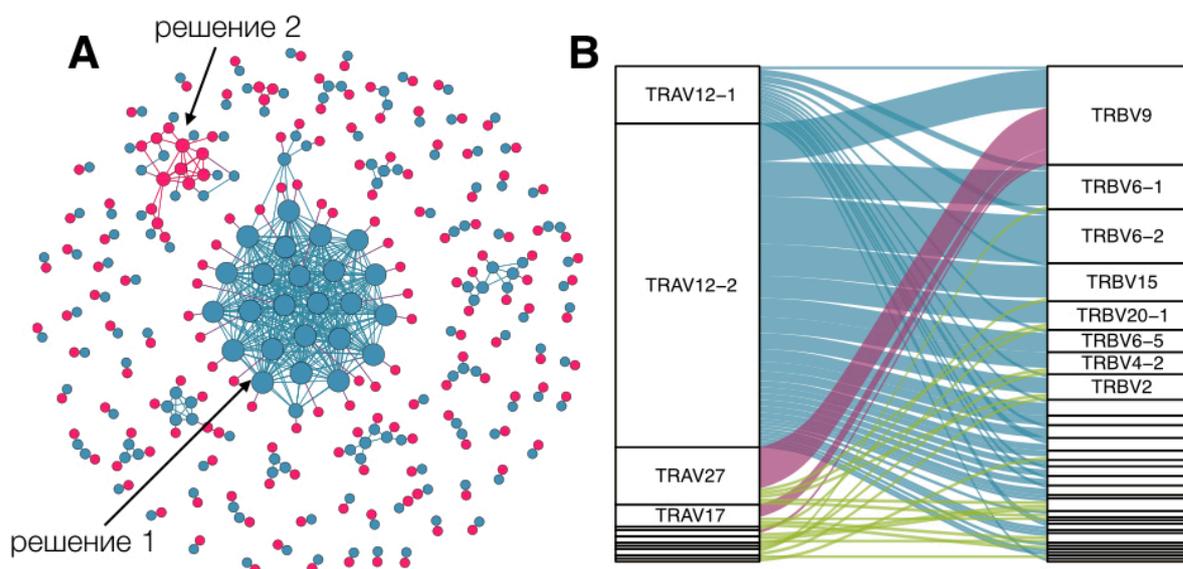


**Рис. 4.** Графы TCR $\alpha$  (A) и  $\beta$  репертуаров (B) NS4B<sub>214-222</sub>-специфических клеток. Каждая вершина представляет собой клонотип. Они соединяются между собой, если клонотипы отличаются не более чем на одну аминокислотную замену. Размер вершины соответствует ее степени (количеству смежных ребер). Изолированные вершины (не имеющие ребер) не показаны. Цветом показаны V-сегменты, частота использования которых в NS4B<sub>214-222</sub>-специфических клонах значимо выше, чем в тотальном репертуаре (точный тест Фишера,  $p < 0.001$  после коррекции методом Бенджамини–Хохберга).

TCR репертуар NS4B<sub>214-222</sub>-специфичных клонов характеризуется неравномерным использованием TRAV и TRBV сегментов, а также превалированием CDR3 с определенной длиной. Так для CDR3 $\alpha$  NS4B<sub>214-222</sub>-специфичных TCR характерна длина 10 аминокислот, а CDR3 $\beta$  длина 13 и 14 аминокислот. V-сегменты TRAV12-1, TRAV12-2, TRAV27 и TRAV17 используются в NS4B<sub>214-222</sub>-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 NS4B<sub>214-222</sub>-специфичных Т-клеток имеют CDR3 длиной 10 аминокислот. Для TCR $\beta$  репертуара NS4B<sub>214-222</sub>-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  $\alpha$ , так и  $\beta$ -цепей TCR. Самые большие кластеры в  $\alpha$  и  $\beta$  репертуарах характеризуются использованием V-сегментов TRAV12-2 и TRBV9 (Рисунок 4).

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

Для того чтобы понять, как описанные кластеры похожих клонов в  $\alpha$  и  $\beta$  репертуарах TCR NS4B<sub>214-222</sub>-специфичных клонотипах соотносятся между собой, была использована технология 10x Genomics для получения парных репертуаров  $\alpha\beta$ TCR. Было отсеквенировано 3500 единичных клеток, специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса ЖЛ. Из этих данных было выделено 164 парных  $\alpha\beta$ TCR. Граф на рисунке 5А показывает не только сходство внутри аминокислотных последовательностей CDR3 $\alpha$  (голубые) и  $\beta$  (розовые), но и то, как они спарены в  $\alpha\beta$ TCR (линии соединяющие вершины разного цвета). Оказалось, что большой кластер похожих TCR $\alpha$ , характеризующийся использованием TRAV12-2, спарен с разными непохожими  $\beta$ -цепями (решение 1), но не с кластером похожих по последовательностям  $\beta$ -цепей, использующих TRBV9 (решение 2).



**Рис. 5.** Структура  $\alpha\beta$ TCR репертуаров NS4B<sub>214-222</sub>-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 $\alpha$  (голубые) или TCR $\beta$  (розовые) клонотипу. Стрелками указаны кластеры, соответствующие ранее обнаруженным самым большим кластерам  $\alpha$  и  $\beta$  репертуаров (см. рисунок 4). **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.

Другой способ визуализации в виде диаграммы потока представлен на рисунке 5В. 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 NS4B<sub>214-222</sub> могут спариваться с любыми

$\beta$ -цепями TCR. Действительно TRAV12-2 обнаруживается в паре с  $\beta$ -цепями, использующими все V- и J-сегменты, и подавляющее большинство CDR3 этих  $\beta$ -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.

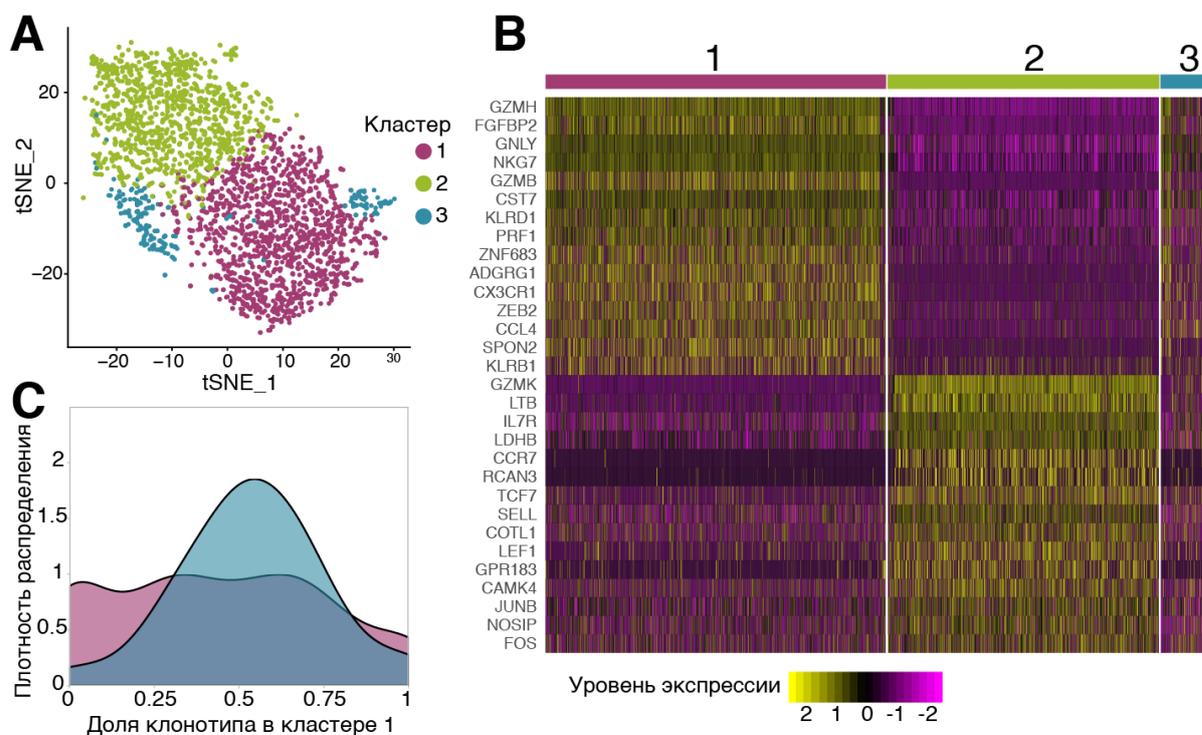
Полученные результаты говорят о том, что для успешного распознавания NS4B<sub>214-222</sub> пептида TCR достаточно соответствовать сравнительно небольшому ряду условий: иметь TRAV12-2 и CDR3 $\alpha$  длины 10 аминокислот и CDR3 $\beta$  длины 13–14 аминокислот. Исходя из известных моделей сборки TCR [Muguan 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-NS4B<sub>214-222</sub>. 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.

## **10. Анализ фенотипического разнообразия NS4B<sub>214-222</sub>-специфических клеток через 1.5 года после вакцинации от желтой лихорадки**

Одновременно с секвенированием парных  $\alpha\beta$ TCR для единичных NS4B<sub>214-222</sub>-специфических клеток через 1.5 года после вакцинации для этих же клеток была отсеквенирована тотальная мРНК (scRNAseq, single cell RNA sequencing).

Было выявлено три группы клеток с различным паттерном генной экспрессии (Рисунок 6А). Чтобы выявить гены экспрессия которых различается между этими кластерами был использован алгоритм MAST (Рисунок 6В). Всего было выявлено 166 дифференциально экспрессированных генов. Кластер 1 характеризуется высокой экспрессией генов, связанных с цитотоксичностью: *GZMB*, *GZMH*, *NKG7*, *PRF1*, *CX3CR1*, *SPON2*, *KLRD1*, а также транскрипционных факторов Hobit и T-bet. 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. 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.



**Рис. 6.** Фенотипическое разнообразие *NS4B*<sub>214-222</sub>-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. **С.** Теоретическое (голубое) и наблюдаемое (розовое) распределение TCR клонов между двумя основными фенотипическими кластерами. Наблюдаемое распределение более плоское, чем теоретическое ( $\chi^2$ -тест  $p=0.0005$ ).

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, 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. Интересно, что в кластере 2 клетки также имеют более высокую экспрессию рибосомальных белков – черта, недавно описанная для предшественников клеток памяти. Дополнительным доказательством возможности перехода клеток из фенотипа 2 в фенотип 1 служит наличие небольшого

кластера клеток 3, которые имеют промежуточный фенотип (Рисунок 6В). Таким образом, на уровне отдельных клеток были охарактеризованы фенотипы NS4B<sub>214-222</sub>-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.

## 11. Анализ распределения клонов Т-клеток между фенотипами

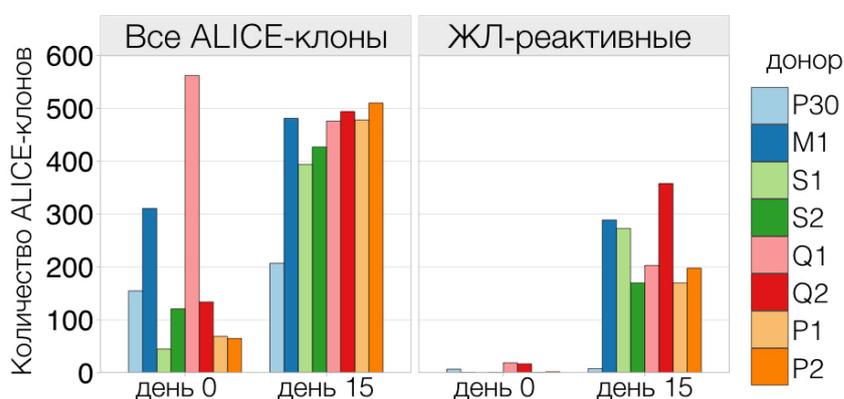
Для всех 3500 клеток из scRNAseq эксперимента также были получены данные о парном  $\alpha\beta$ TCR. Имея такие данные, можно попробовать выяснить имеется ли место зависимость клеточного фенотипа от последовательности его TCR. Для этого было получено теоретическое распределение клонов между фенотипами, при условии, что клоны распределены между двумя основными фенотипами случайно (голубая кривая плотности на рисунке 6С). 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 6С). Другими словами, есть ЖЛ-реактивные клоны, которые в представлены только в одном из кластеров. Таким образом было показано, что TCR клонотипы связаны с фенотипом клеток памяти, причем даже внутри одной антигенной специфичности.

## 12. Использование особенностей аминокислотных последовательностей TCR для идентификации ЖЛ клонов



**Рис. 7.** 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, селективированные на антиген (красные), от клонотипов, имеющих много соседей из-за особенностей сборки TCR (голубые, фиолетовые и зеленые кластеры).

Было отмечено, что в процессе иммунного ответа на вакцину от ЖЛ в секвенированных репертуарах появляются кластеры похожих ЖЛ-реактивных клонов. 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. 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 7). 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. 8.** 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 был применен к TCR репертуарам, полученным до вакцинации против желтой лихорадки (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 8. 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 последовательностей ЖЛ-реактивных TCR.

## 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 $\alpha$  и TCR $\beta$  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.

## 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 $\alpha$  и TCR $\beta$  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 Т-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  $\alpha$ , так и  $\beta$ -цепей TCR. Предложен оригинальный биоинформатический алгоритм восстановления  $\alpha\beta$  пар TCR на основе сходства клональных траекторий TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  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 Т-клеток памяти, специфичных к иммунодоминантному эпитопу, после первичной вакцинации выявил наличие двух основных фенотипов и неслучайное распределение клонов Т-клеток между этими фенотипами.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи

1. Pogorelyy M.V., **Minervina A.A.**, Chudakov D.M., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B., Mora T., Walczak A.M. Method for identification of condition-associated public antigen receptor sequences. // *Elife*. 2018. Т. 7. С. 1–12.
2. Pogorelyy M.V., **Minervina A.A.**, Touzel M.P., Sycheva A.L., Komech E.A., Kovalenko E.I., Karganova G.G., Egorov E.S., Komkov A.Y., Chudakov D.M., Mamedov I.Z., Mora T., Walczak A.M., Lebedev Y.B. 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 M.V.\*, **Minervina A.A.\***, Shugay M., Chudakov D.M., Lebedev Y.B., Mora T., Walczak A.M. Detecting T cell receptors involved in immune responses from single repertoire snapshots // *PLoS Biol*. 2019. Т. 17. № 6. С. e3000314., \* - равный вклад
4. **Minervina A.A.**, Pogorelyy M.V., Mamedov I.Z. T-cell receptor and B-cell receptor repertoire profiling in adaptive immunity // *Transpl Int*. 2019. Т. 32. № 11. С. 1111–1123.
5. **Minervina A.A.**, Pogorelyy M.V., Komech E.A., Karnaukhov V.K., Bacher P., Rosati E., Franke A., Chudakov D.M., Mamedov I.Z., Lebedev Y.B., Mora T., Walczak A.M. 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