

**ПРОДОЛЖИТЕЛЬНЫЙ ТРЕКИНГ РЕПЕРТУАРА Т-КЛЕТОК
ПОЗВОЛЯЕТ ДЕТЕКТИРОВАТЬ УСТОЙЧИВЫЙ CD4+ КЛАСТЕР
КЛОНОВ, СПЕЦИФИЧЕСКИХ К ЖЁЛТОЙ ЛИХОРАДКЕ**

Сальникова М. А. ^{1, 2},
Лебедев Ю. Б. ²

¹ Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия.

² ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова” Российской академии наук, г. Москва, Россия.

**LONGITUDINAL TRACKING OF T CELL REPERTOIRE REVEALS
LONG-LASTING CD4+ YELLOW FEVER SPECIFIC CLONE CLUSTER**

Salnikova M. A. ^{a, b},
Lebedev Yu. B. ^b

^a Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation.

^b Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russian Federation.

Резюме

Адекватное функционирование адаптивной иммунной системы при острой вирусной инфекции невозможно представить без Т-клеток. Т-клетки не только элиминируют зараженные вирусом клетки и участвуют в формировании иммунологической памяти, а также косвенно модулируют гуморальный ответ через селекцию и поддержание специфических В-клеток. Т-клеточный рецептор (TCR) распознает процессированный антиген, представленный на поверхности клеток в МНС одного из двух классов. Таким образом, сформировавшийся репертуар TCR отражает историю встреченных антигенов через призму данного организма с конкретным набором МНС. Для исследования изменения репертуара TCR в ответ на острую вирусную инфекцию мы воспользовались моделью вакцинации от желтой лихорадки. Вакцина от желтой лихорадки уже больше полувека является эталоном как по безопасности, так и по эффективности. Основой вакцины является живой аттенуированный вирус, что позволяет исследовать иммунный ответ в условиях, максимально приближенных к заражению вирусом дикого типа. ЖЛ-специфический Т-клеточный ответ на иммунодоминантные пептиды, представляемые на HLA-A02 подробно изучен, однако данных от исследований иммунного ответа доноров, не несущих HLA-A02 аллель пока что мало.

Целью данной работы стало рассмотрение динамики изменений структуры Т-клеточного репертуара, которые происходят в ответ на вакцинацию от ЖЛ у донора, не имеющего HLA-A02 аллель.

В ходе работы мы обнаружили, что общая картина ответа сходна с таковой у доноров HLA-A02 положительных: вакцинация вызывает обширную экспансию ЖЛ-реактивных клонов на 14 день. Несмотря на отсутствие известного иммунодоминантного эпитопа для HLA аллелей первого класса данного донора, его ответ также был сдвинут в сторону CD8⁺ Т-клеток, и их доля возросла к 53 дню. Аминокислотные последовательности CDR3 TCR beta ЖЛ-реактивных клонов не образуют большого количества кластеров. Самый большой кластер образован CD4⁺ Т-клетками, что вместе с обширной экспансией ЖЛ-специфических клонов подтверждает наличие новых иммуногенных эпитопов.

Ключевые слова: Т-клеточный рецептор, специфичность, репертуар, желтая лихорадка, вакцинация, острая, вирусная, инфекция, рестрикция, клон, кластер, адаптивный иммунитет.

Abstract

infection is inconceivable without T cells. T cells not only eliminate virus-infected cells and participate in the formation of immunological memory, but also indirectly modulate the humoral response through the selection and maintenance of specific B cells. The T cell receptor (TCR) recognizes processed antigen presented on the surface of cells in the MHC of one of two classes. Thus, the formed TCR repertoire reflects the history of encountered antigens through the prism of the specific organism with a particular set of MHC. To investigate changes in the TCR repertoire in response to acute viral infection, we utilized a yellow fever vaccination model. The yellow fever vaccine has been a benchmark for both safety and efficacy for over half a century. The vaccine is based on a live attenuated virus, allowing the study of the immune response under conditions closely to the viral infection. The yellow fever-specific T cell response to immunodominant peptides presented on HLA-A02 is well studied, but experiments with HLA-A02-negative donors are still lacking.

The aim of this study was to examine the dynamics of changes in the T cell repertoire structure that occur in response to yellow fever vaccination in a donor without the HLA-A02 allele. We found that the overall T cell response dynamics was similar to that in HLA-A02-positive donors: vaccination led to rapid expansion of yellow fever-reactive clones by day 14. Despite the absence of a known immunodominant epitope for HLA I alleles in this donor, the immune response also shifted towards CD8⁺ T cells, with increasing of the CD8⁺ clones fraction by day 53. The amino acid sequences of CDR3 TCR beta yellow fever specific clones formed a stable cluster by CD4⁺ T cells, further confirming the presence of novel immunogenic epitopes.

Keywords: TCR, specific, repertoire, YF17D, vaccination, acute, virus, infection, HLA, MHC, restriction, clone, cluster, adaptive immunity.

1 Введение

Проблема острых вирусных инфекций продолжает быть актуальной [2]. Основная сложность изучения иммунного ответа человека на острые вирусные инфекции это отсутствие возможности постановки контролируемого эксперимента. Наиболее удачной моделью острой вирусной инфекции является вакцинация от желтой лихорадки (ЖЛ). Изобретатель вакцины, Макс Тейлер, получил Нобелевскую премию в 1951 году “За открытия, связанные с желтой лихорадкой, и борьбу с ней” [6]. В основе вакцины аттенуированный вирус, который как и дикий тип вируса вызывает виремию, позволяя изучать иммунный ответ в условиях максимально близких к вирусной инфекции.

Т-клетки играют важную роль в противовирусной защите, участвуя во множестве процессов от элиминации вирусных частиц до формирования иммунологической памяти. Специфическое распознавание антигена Т-клетками происходит в ходе взаимодействия Т-клеточного рецептора (TCR) с процессированным антигеном, встроенным в главный комплекс гистосовместимости (МНС). Участок, принимающий наибольшее участие во взаимодействии с антигеном (CDR3) находится на TCR beta цепи и отличается крайней вариабельностью, формирующейся в процессе V(D)J рекомбинации. Применение технологий секвенирования нового поколения совместно с стратегиями пробоподготовки позволяет преодолевать основную сложность исследования репертуара – огромное разнообразие последовательностей TCR [5]. Всё вместе создаёт для изучения изменений Т-клеточного репертуара в ответ на вакцинацию от желтой лихорадки.

Динамика Т-клеточного ответа на первичную вакцинацию от желтой лихорадки характеризуется выраженной экспансией как CD8+, так и CD4+ Т-клеток на 14 день после вакцинации [11]. Репертуар ЖЛ-специфических Т-клеток подробно изучен для доноров, обладающих аллелем HLA-A02 [7], самым распространенным аллелем среди европейских доноров [8]. Найдена аминокислотная последовательность TCR CDR3 региона, распознающего иммуногенный эпитоп NS4B вирусного белка, представленного на HLA-A02, а также исследован ответ на вторичную вакцинацию [4]. Несмотря на это, данных о ЖЛ-специфическом Т-клеточном ответе доноров, не несущих аллель HLA-A02, намного меньше. При этом естественные резервуары желтой лихорадки географически не пересекаются с регионами широкого распространения HLA-A02 аллеля [3], поэтому исследование ЖЛ-специфических Т-клеток доноров, не несущих аллель HLA-A02 имеет особую клиническую значимость.

В данной работе мы подробно рассматриваем специфический Т-клеточный ответ на вакцинацию от желтой лихорадки у донора, не обладающего аллелем HLA-A02.

2 Материалы и методы

42 Образцы крови

43 Вакцинацию проводили живой аттенуированной вакциной YF17D, забор
44 крови проводился в сертифицированной диагностической лаборатории.
45 Мононуклеарные клетки периферической крови были выделены с помощью
46 стандартного протокола центрифугирования в градиенте плотности (фиколл,
47 1,077 г/см³, ПанЭко, Россия) из 8 мл крови для каждой повторности.
48 Выделение субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺ осуществляли с использованием
49 магнитной сепарации и позитивной селекции Dynabeads (Invitrogen, США) из
50 4 мл крови в каждой временной точки. РНК выделяли стандартным
51 протоколом для Trizol реагента.

52 HLA-типирование

53 Стартовый материал для HLA-типирования брали из аликвоты РНК
54 выделенной из мононуклеарных клеток периферической крови. Синтез кДНК
55 библиотеки происходил с использованием праймеров на участки высокой
56 консервативности HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DQB, HLA-DRB локусов.
57 Полученную библиотеку секвенировали на платформе Illumina MiSeq в
58 режиме 2x250 пн, полученные данные обрабатывались в среде R с помощью
59 автоматизированного алгоритма.

60 Приготовление библиотек alpha и beta TCR, секвенирование

61 Библиотеки alpha и beta TCR подготавливались по ранее разработанному
62 протоколу [7] с незначительными доработками. Основной особенностью
63 нашей пробоподготовки является внедрение уникальных молекулярных
64 баркодов с использованием эффекта смены матрицы ревертазой на 5'-конце,
65 что позволяет подсчитать количество молекул мРНК на старте и исправить
66 ошибки ПЦР при последующей обработке. Библиотеки были секвенированы
67 на платформе Illumina NovaSeq в режиме 2x150 пн.

68 Обработка полученных данных

69 Сырые данные секвенирования были обработаны с помощью специального
70 программного обеспечения MIGEC [10] и MiXCR [1], которое позволяет
71 скорректировать ошибки секвенирования, подсчитать количество уникальных
72 молекул мРНК, а также провести выравнивание V, D и J сегментов. Для
73 дальнейшего анализа полученных таблиц клонсетов были использованы
74 пакеты tidyverse, data.table в среде программирования R studio. Для построения
75 графиков использовался пакет ggplot2.

76 3 Результаты и обсуждение

77 На первом этапе мы провели генотипирование донора и обнаружили у него
78 следующие HLA-аллели: A*24:02:01; A*30:01:01; B*13:02:01; B*35:02:01;
79 C*04:01:01; C*06:02:01; DQB1*02:02:01; DQB1*03:01:01; DRB1*07:01:01;
80 DRB1*11:04:01. Эксперимент проводили согласно следующей схеме: на день

0, до вакцинации, у донора забиралась кровь с последующим выделением РВМС и разделением на фракции CD4⁺ и CD8⁺, в этот же день проходила вакцинация донора YF17D. Далее у донора снова забиралась кровь с аналогичными шагами пробоподготовки на 15, 25, 34 и 53 день после вакцинации. На основе всех полученных образцов готовились библиотеки кДНК для дальнейшего секвенирования и реконструкции репертуаров TCR beta. Для того, чтобы обнаружить Т-клеточные клоны, отвечающие на вакцинацию YF17D, мы воспользовались пакетом для анализа дифференциальной экспрессии генов edgeR [9]. Мы смогли детектировать 584 клонов значимо увеличивших свою концентрацию на 15 день после вакцинации. Такие клоны занимают 3,9% от всего репертуара на 15 день (рис 1). Что согласуется с ранее опубликованными данными, описывающими Т-клеточный ответ на первичную вакцинацию YF17D как быстро развивающийся с сильной клональной экспансией [11]. Для того, чтобы проследить за динамикой Т-клеточного ответа на вакцинацию от вируса желтой лихорадки мы рассмотрели изменение доли YF-специфических клонов от всего репертуара на 15, 25, 34 и 53 (рис 1). Ко дню 25 доля отвечающих клонов снизилась и продолжала плавно снижаться до дня 53. Проанализировав вклад клеток с разным фенотипом в Т-клеточный ответ на вакцинацию, оказалось, что ответ сдвинут в сторону CD8⁺ Т клеток (рис 2), как и для доноров HLA-A02 положительных. При этом доля CD8⁺ Т-клеток возросла к 53 дню, что может свидетельствовать об продолжительном участии в элиминации зараженных клеток и временном сдвиге CD8⁺ ответа. Несмотря на отсутствие известного иммуногенного эпитопа для данного набора HLA I класса, мы оценили схожесть аминокислотных последовательностей CDR3 TCR beta отвечающих клонов с помощью граф анализа (рис 3). ЖЛ-специфические клоны данного донора образуют меньше кластеров, чем клоны HLA-A02 положительных доноров [7], при этом большинство из них образовано CD4⁺ Т-клетками. Клоны из самого большого CD4⁺ кластера сохранялись до 53 дня после вакцинации, что может указывать на наличие иммуногенного вирусного эпитопа, представленного на HLA II класса.

3 Заключение

В данной работе мы подробно рассмотрели динамику и клональный состав Т-клеточного ответа на вакцинацию от желтой лихорадки донора с нераспространенным HLA генотипом. Общая динамика ответа была схожей с опубликованными данными, на 15 день после вакцинации мы смогли детектировать 584 ЖЛ-специфических клона, которые составляли 3,9% от всего репертуара TCR beta. Интересно, что несмотря на отсутствие известного иммуногенного эпитопа для HLA I класса у данного донора, среди отвечающих клонов преобладали CD8⁺ Т-клетки, увеличившие свою долю к 53 дню. Однако, аминокислотные кластеры CDR3 были образованы в большей части CD4⁺ Т-клетками, самый большой кластер был нами охарактеризован и

123 сохранялся до 53 дня. Таким образом, были показаны важные отличия в Т-
124 клеточном ответе, связанные с набором HLA аллелей.

РИСУНКИ

Рисунок 1. Динамика Т-клеточного ответа на вакцинацию YF17D. Доля ЖЛ-специфических TCR beta клонов от всего репертуара в различных точках до и после вакцинации.

Figure 1. Dynamics of the T cell response towards YF17D vaccination. Fraction of the YF-specific TCR beta from the whole repertoire in different timepoints.

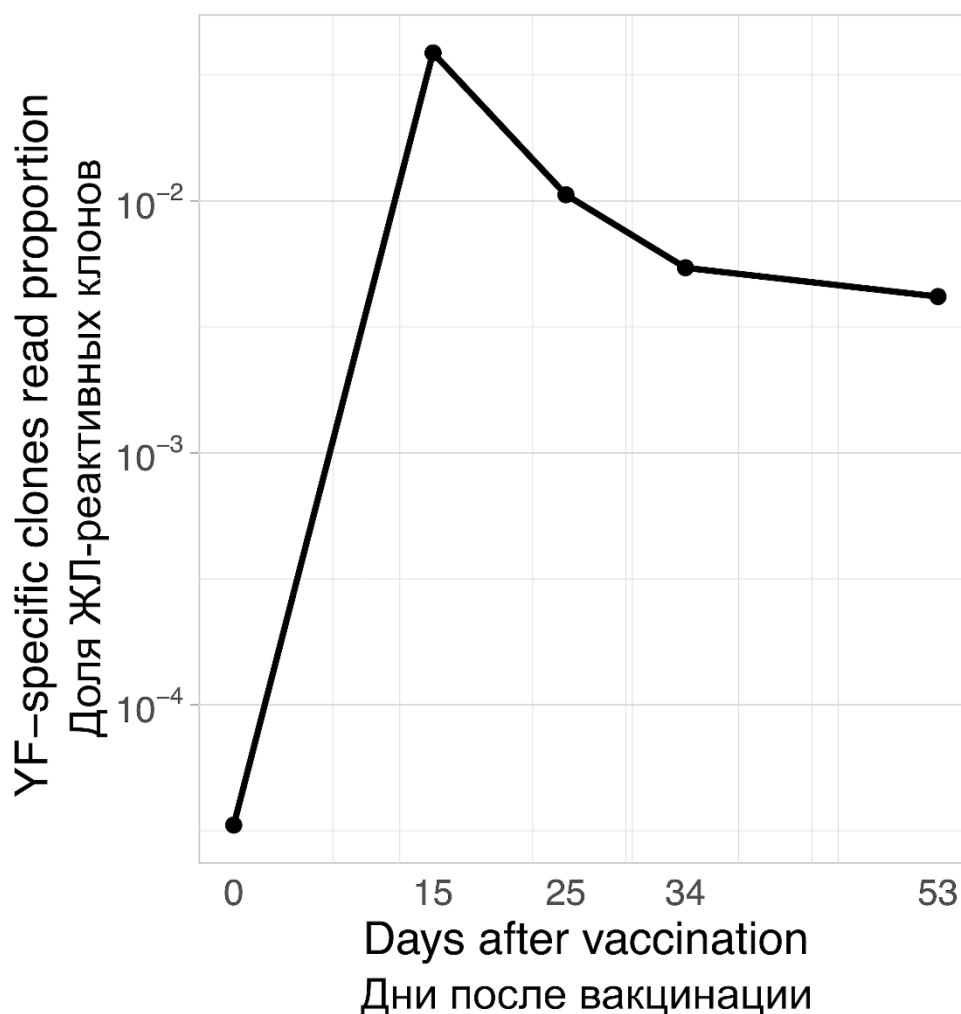


Рисунок 2. Фенотипический состав ЖЛ-специфических клонов. Доля CD8⁺ и CD4⁺ популяций среди всех ответивших клонов в различных точках после вакцинации.

Figure 2. Phenotypes of the YF-specific clones. Fraction of the CD8⁺ and CD4⁺ populations from all expanded clones in different timepoints.

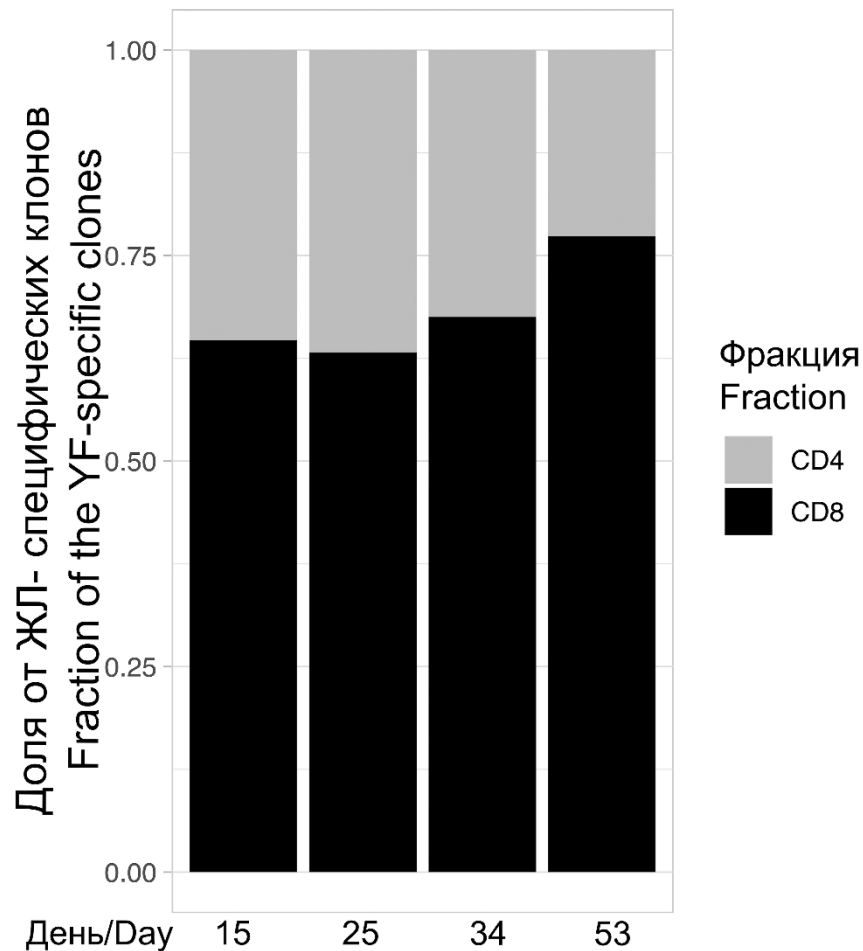
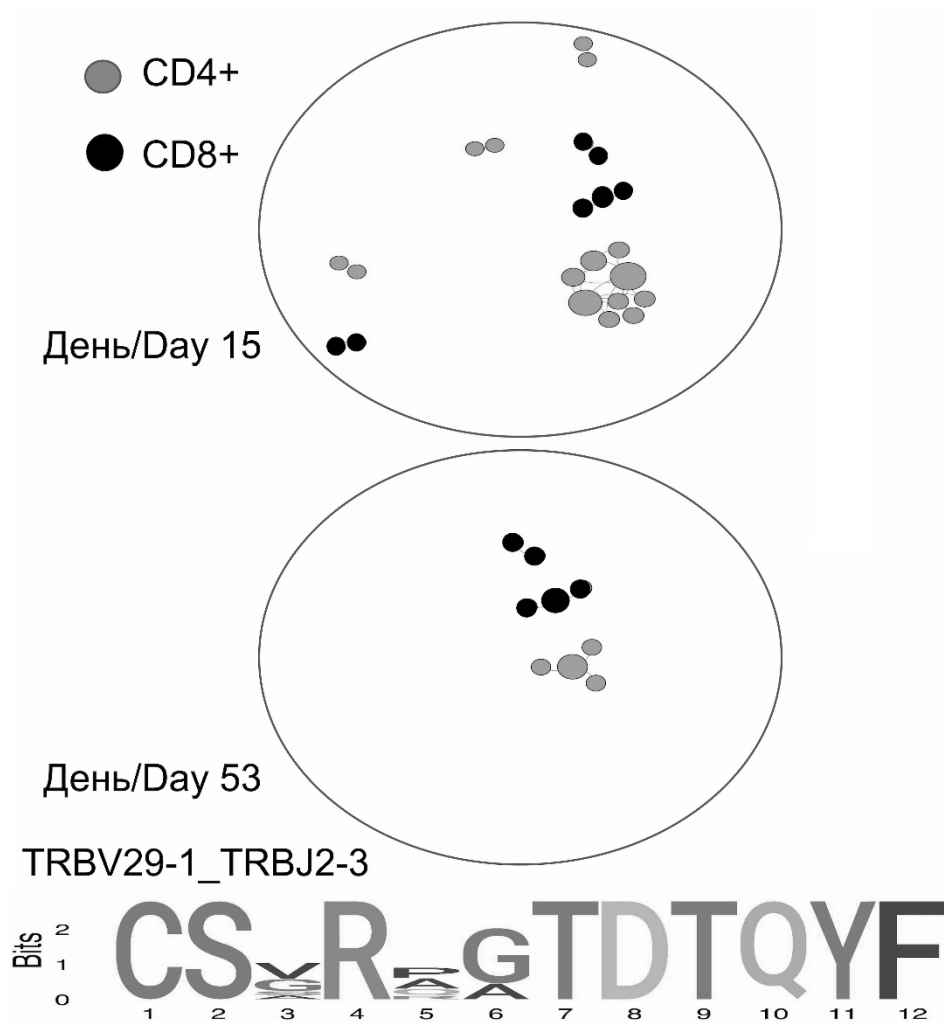


Рисунок 3. Графы для ЖЛ-специфических клонов. Каждая точка на графе обозначает отдельный клонотип. Черным цветом обозначены CD8⁺ клоны, серым CD4⁺. Приведен консенсусный мотив для самого большого кластера.

Figure 3. Graphs of the YF-specific clones. Each dot represents a clonotype. Black colour represents CD8⁺ clones, grey CD4⁺. The consensus motif of the largest cluster is shown.



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Сальникова Мария Алексеевна – аспирант каф. иммунологии Биологического факультета Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; инженер-исследователь ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова” Российской академии наук, г. Москва, Россия;

адрес: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

телефон: 8(916)957-37-75;

e-mail: msalniku@yandex.ru

Mariia A. Salnikova – Postgraduate Student, Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University; engineer-researcher Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russian Federation; address: 117997, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 16/10;

telephone: 8(916)957-37-75;

e-mail: msalniku@yandex.ru

Блок 2. Информация об авторах

Лебедев Юрий Борисович – д.б.н., профессор, заведующий лабораторией сравнительной и функциональной геномики ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова” Российской академии наук, г. Москва, Россия;

Yuri B. Lebedev – PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Comparative and Functional genomics Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russian Federation;

Блок 3. Метаданные статьи

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНЫЙ ТРЕКИНГ РЕПЕРТУАРА Т-КЛЕТОК ПОЗВОЛЯЕТ
ДЕТЕКТИРОВАТЬ УСТОЙЧИВЫЙ CD4+ КЛАСТЕР КЛОНОВ,
СПЕЦИФИЧЕСКИХ К ЖЁЛТОЙ ЛИХОРАДКЕ

LONGITUDINAL TRACKING OF T CELL REPERTOIRE REVEALS LONG-
LASTING CD4+ YELLOW FEVER SPECIFIC CLONE CLUSTER

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ВАКЦИН-АССОЦИИРОВАННЫЕ Т-КЛЕТКИ

VACCINE-ASSOCIATED T CELLS

Ключевые слова: Т-клеточный рецептор, специфичность, репертуар, желтая лихорадка, вакцинация, острая, вирусная, инфекция, рестрикция, клон, кластер, адаптивный иммунитет.

Keywords: TCR, specific, repertoire, YF17D, vaccination, acute, virus, infection, HLA, MHC, restriction, clone, cluster, adaptive immunity.

Объединенный иммунологический форум 2024.

Количество страниц текста – 4,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 3.

27.03.2024

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядков й номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Bolotin D. A., Poslavsky S., Mitrophanov I., Shugay M., Mamedov I. Z., Putintseva E. V., Chudakov D. M. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. <i>Nat. Methods</i> , 2015, Vol. 12, no. 5, pp. 380– 381.	-	doi: 10.1038/nmeth.3364
2	Chams N., Chams S., Badran R., Shams A., Araj A., Raad M., Mukhopadhyay S., Stroberg E., Duval E. J., Barton L. M., Hajj Hussein I. COVID-19: A Multidisciplinary Review. <i>Frontiers in Public Health</i> , 2020, Vol. 8, p. 383.	-	doi: 10.3389/fpubh.2020.00383
3	Gonzalez-Galarza F. F., McCabe A., Santos E. J. M. D., Jones J., Takeshita L., Ortega-Rivera N. D., Cid-Pavon G. M. D., Ramsbottom K., Ghattaoraya G.,	-	doi: 10.1093/nar/gkz1029.

	Alfirevic A., Middleton D., Jones A. R. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. <i>Nucleic Acids Res.</i> , 2019, Vol. 48, no. D1, pp. D783-D788.		
4	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. <i>eLife</i> , 2020, Vol. 9, p. e53704.	-	doi: 10.7554/eLife.53704.
5	Minervina, A., Pogorelyy, M., Mamedov, I. T-cell receptor and B-cell receptor repertoire profiling in adaptive immunity. <i>Transpl. Int.</i> , 2019, Vol. 32, no. 11, pp. 1111–1123.	-	doi: 10.1111/tri.13475
6	Norrby E. Yellow fever and Max Theiler: the only Nobel Prize for a virus vaccine. <i>J. Exp. Med.</i> , 2007, Vol. 204,		doi: 10.1084/jem.20072290

	no. 12, pp. 2779–2784.		
7	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. Yu., 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. <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> , 2018, Vol. 115, no. 50, pp. 12704–12709.	-	doi: 10.1073/pnas.1809642115
8	Robinson J., Halliwell J. A., McWilliam H., Lopez R., Parham P., Marsh S. G. E. The IMGT/HLA database. <i>Nucleic Acids Res.</i> , 2012, Vol. 41, no. D1, pp. D1222–D1227.	-	doi: 10.1093/nar/gks949
9	Robinson M. D., McCarthy D. J., Smyth G. K. edgeR : a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. <i>Bioinformatics</i> , 2010, Vol. 26, no. 1, pp.	-	doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.

	139–140.		
10	Shugay M., Britanova O. V., Merzlyak E. M., Turchaninova M. A., Mamedov I. Z., Tuganbaev T. R., Bolotin D. A., Staroverov D. B., Putintseva E. V., Plevova K., Linnemann C., Shagin D., Pospisilova S., Lukyanov S., Schumacher T. N., Chudakov D. M. Towards error-free profiling of immune repertoires. <i>Nat. Methods</i> , 2014, Vol. 11, no. 6, pp. 653–655.	-	doi: 10.1038/nmeth.2960.
11	Wieten R. W., Jonker E. F. F., Van Leeuwen E. M. M., Remmerswaal E. B. M., Ten Berge I. J. M., De Visser A. W., Van Genderen P. J. J., Goorhuis A., Visser L. G., Grobusch M. P., De Bree G. J. A Single 17D Yellow Fever Vaccination Provides Lifelong Immunity; Characterization of Yellow-Fever-Specific Neutralizing Antibody and T-Cell Responses after Vaccination. <i>PLOS ONE</i> , 2016, Vol. 11, no. 3, p. e0149871.	-	doi:10.1371/journal.pone.0149871

