

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

на правах рукописи

Израельсон Марк Александрович

Организация адаптивного иммунитета долгоживущего грызуна
Spalax galili

Специальность – 1.5.3. – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2022

Работа выполнена в группе структурной организации Т-клеточного иммунитета Отдела геномики адаптивного иммунитета в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Британова Ольга Владимировна, кандидат биологических наук

Научный консультант:

Чудаков Дмитрий Михайлович, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН

Официальные оппоненты:

Купраш Дмитрий Владимирович, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН. Главный научный сотрудник лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Чуров Алексей Викторович, кандидат биологических наук, Директор Института изучения старения, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

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

Защита диссертации состоится 22 февраля 2023 г. в 11.00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.037.01 при ИБХ РАН по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и на сайте www.ibch.ru.

Автореферат разослан ____ _____ 20__ г.

**Ученый секретарь диссертационного совета, доктор физико-математических наук
В.А. Олейников**



Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Адаптивный иммунитет играет важную роль в жизни человека и других живых организмов, специфически распознавая и уничтожая различные патогены. Однако с возрастом в организме происходят изменения, которые снижают способность организма эффективно противостоять различным инфекциям, процессам злокачественных новообразований.

С возрастом иммунитет теряет свою пластичность. В популяциях Т и В лимфоцитов накапливаются клональные экспансии эффекторных клеток, а продуцирование новых наивных клеток сокращается в результате инволюции тимуса, снижения пролиферации клеток костного мозга, и накопления в них мутаций. В старости наблюдается экспансия большого количество высокодифференцированных Т и В клеточных популяций, а также аутоиммунных лимфоцитов. Все это напрямую влияет на продолжительность жизни, увеличивая вероятность смерти с возрастом.

Одним из подходов к изучению проблем старения, является изучение долгоживущих организмов (летучие мыши, голый землекоп), так как потенциально в организации их молекулярно-генетических процессов могут скрываться механизмы, влияющие на их долголетие.

Spalax galili грызун, обитающий под землей, для которого характерна высокая продолжительность жизни относительно его размера. Кроме того, у этого вида отсутствует спонтанное возникновение онкологических новообразований, а при подсадке модельных раковых клеток от других животных, они уничтожаются и не приживаются.

В данной работе мы охарактеризовали устройство адаптивного иммунитета *Spalax galili*. С этой целью мы разработали протокол получения кДНК библиотек репертуаров Т и В лимфоцитов спалакса и описали локусы, кодирующие сегменты генов, кодирующих соответствующие рецепторы. Затем мы провели анализ изменений иммунных репертуаров с возрастом в сравнении с мышью и человеком.

Также мы проанализировали транскриптом слепышей и мышей разных возрастных групп, и сравнили динамику изменения экспрессии основных генов отвечающих за функционирование, регуляцию и дифференцировку различных популяций лимфоцитов.

Настоящая работа помогает пролить свет на механизмы, частично отвечающие за долгожительство *Spalax galili*.

Цель работы

Цель настоящей работы заключалась в исследовании молекулярно-генетических характеристик Т и В лимфоцитов долгоживущего грызуна *Spalax galili* и их изменения с возрастом.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Используя данные TCR репертуаров мононуклеаров мышей, подобрать метрику разнообразия TCR, которая коррелирует с возрастом и долей наивных клеток и в меньшей степени зависит от глубины секвенирования.
2. Разработать протокол для получения кДНК библиотек α - и β -цепей TCR, а также тяжелых цепей иммуноглобулинов с использованием тотальной РНК из клеток селезенки слепыша.
3. Подготовить библиотеки кДНК и с помощью высокопроизводительного секвенирования получить данные репертуаров α - и β -цепей TCR и тяжелых цепей иммуноглобулинов, а также данные транскриптомов клеток селезенки слепышей и мышей C57BL/6J для разных возрастных групп.
4. Провести сравнительный анализ возрастной динамики свойств иммунных репертуаров между слепышами и мышами.

5. Провести сравнительный анализ возрастных изменений экспрессии генов, отвечающих за функционирование и дифференцировку популяций Т- и В-лимфоцитов у слепышей и мышей.

6. Провести сравнительный анализ возрастных изменений экспрессии генов отвечающих за функционирование и дифференцировку Т- и В-лимфоцитов у слепыша и мышей.

Научная новизна и практическая ценность работы

Изучение иммунитета в немодельных объектах представляет особый интерес. В силу особенностей своего строения и/или среды обитания такие организмы могут задействовать ранее не описанные механизмы борьбы с инфекциями, раком и старением. Открытие этих механизмов может помочь при разработке препаратов для лечения людей.

В нашей работе мы исследовали особенности организации адаптивного иммунитета слепыша (*Spalax galili*) - подземного грызуна принадлежащего суперсемейству *Muroidea*. Слепыши обладают очень высокой продолжительностью жизни для своего размера, максимально задокументированный возраст - 21 год. Также эти животные проявляют высокую устойчивость к раку, для них не было показано спонтанного возникновения злокачественных новообразований.

В ходе нашей работы мы разработали метод получения кДНК библиотек репертуаров Т-клеточных и В-клеточных рецепторов слепыша. Кроме того мы создали референс генных сегментов этих рецепторов для работы с данными иммунных репертуаров этого вида.

Используя разработанные нами методы, мы провели сравнительный анализ старения адаптивного иммунитета у слепыша и мыши. Мы показали, что слепыши обладают ранее не описанными для других млекопитающих особенностями адаптивного иммунитета, в том числе у них с возрастом не наблюдается падения разнообразия репертуара Т-клеточных рецепторов в периферических органах.

Данные транскриптома слепышей разного возраста, а также анализ свойств репертуара говорят о наличии у этих зверей высокой клональности наивного Т-клеточного репертуара и пониженного уровня дифференцировки в клетки памяти и другие популяции.

Наши результаты показывают важность изучения устройства адаптивного иммунитета немодельных объектов. Нам удалось обнаружить важные особенности организации иммунитета у долгоживущего грызуна *Spalax galili*, позволяющие ему избегать многих проблем, возникающих у других известных млекопитающих с возрастом. Дальнейшие исследования в этой области представляют большой интерес.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 135 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания цели и задач, материалов и методов исследования, результатов, заключения, списка сокращений, списка опубликованных работ по теме диссертации, списка литературы, включающего 184 источника и приложения. Диссертация содержит 32 рисунка и 6 таблиц в основной части и 3 таблицы в приложении.

Апробация работы

Основные результаты диссертации были изложены во время научного семинара.

Публикации

По результатам работы опубликовано 4 публикации в рецензируемых зарубежных журналах.

Содержание работы

1. Подбор метода оценки разнообразия иммунных репертуаров

Определение полного разнообразия T-клеточных рецепторов является не тривиальной задачей, ограниченной размерами образца и ограничениями методов экстраполяции. Кроме того, сравнение образцов между собой осложнено тем, что большинство используемых метрик разнообразия зависят от глубины анализа, которая часто варьируется от образца к образцу даже в стандартизованных экспериментах. Для нивелирования различной глубины секвенирования при сравнении образцов используют различные методы нормировки.

Для того чтобы подобрать метрику разнообразия и проверить эффект нормализации на молекулярные баркоды мы провели сравнительный анализ разнообразия CDR3 регионов бета цепей TCR 8 молодых мышей (3 мес) и 8 старых (2 года). Для каждого образца мы также определили процент наивных T-лимфоцитов (CD62L+CD44-) при помощи проточной цитометрии с окрашиванием поверхностных маркеров. Учитывая, что у мышей разнообразие T-клеточного репертуара снижается с возрастом из-за уменьшения доли наивных T-лимфоцитов мы посчитали корреляцию между различными метриками разнообразия и возрастом, а также между метриками и процентом наивных T-клеток, используя это как метод определения точности конкретной метрики.

Исходя из результатов эксперимента мы выбрали три метрики разнообразия и алгоритм обработки данных для их использования, которые лучше всего коррелировали как с возрастом, так и с процентом наивных клеток. Метрики Шеннона-Винера, Chao1 и наблюдаемое разнообразие в образце с коррекцией ошибок и нормировкой на количество UMI продемонстрировали наибольшую корреляцию с процентом наивных клеток. Причем, Chao1 и наблюдаемое разнообразие значительно лучше коррелируют с процентом наивных клеток при использовании коррекции ошибок и нормализации на количество UMI. В то же время, индекс Шеннона-Винера меньше зависел от нормировки и может быть использован в случаях, когда по тем или иным причинам данные невозможно нормализовать.

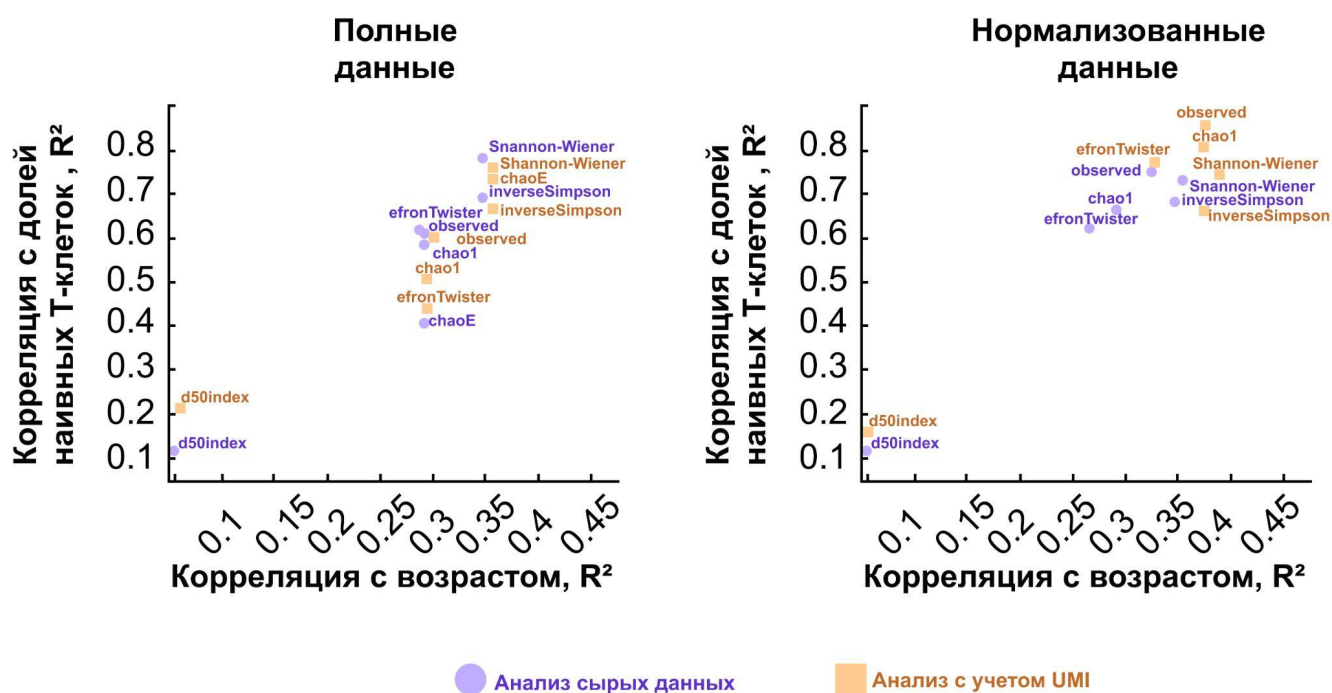


Рисунок 1. Корреляция Спирмена метрик разнообразия CDR3 β TCR в периферической крови у молодых и старых мышей с возрастом и процентом наивных клеток. Фиолетовые маркеры - данные обработаны MiXCR. Оранжевые маркеры - данные обработаны с коррекции ошибок секвенирования на основе UMI (MiGEC + MiXCR). Слева в анализ были взяты все доступные UMI группы / ряды в каждом образце. Справа данные были нормированы на 15000 UMI \ 15000 рядов.

2. Разработка метода получения кДНК библиотек альфа и бета цепей TCR и тяжелых цепей иммуноглобулинов (IGH)

Ген-специфичные праймеры к генным сегментам слепыша, кодирующим константные области α - и β -цепей TCR и изотипов иммуноглобулинов, были разработаны путем анализа выравнивания последовательностей соответствующих гомологичным генным сегментам мыши, человека и крысы с опубликованными данным транскриптома слепыша.

Разработанные праймеры были использованы для приготовления кДНК библиотек TCR и иммуноглобулинов с использованием технологии 5'RACE со сменой матрицы с использованием молекулярного баркодирования. (Рис. 2)

Молекулярные баркоды, встраивались на стадии синетза 1й цепи кДНК, помечая каждую исходную молекулу. Это позволяет скорректировать возникающие

при амплификации мутации, а также дает возможность нормироваться на количество исходных молекул при сравнительном анализе.

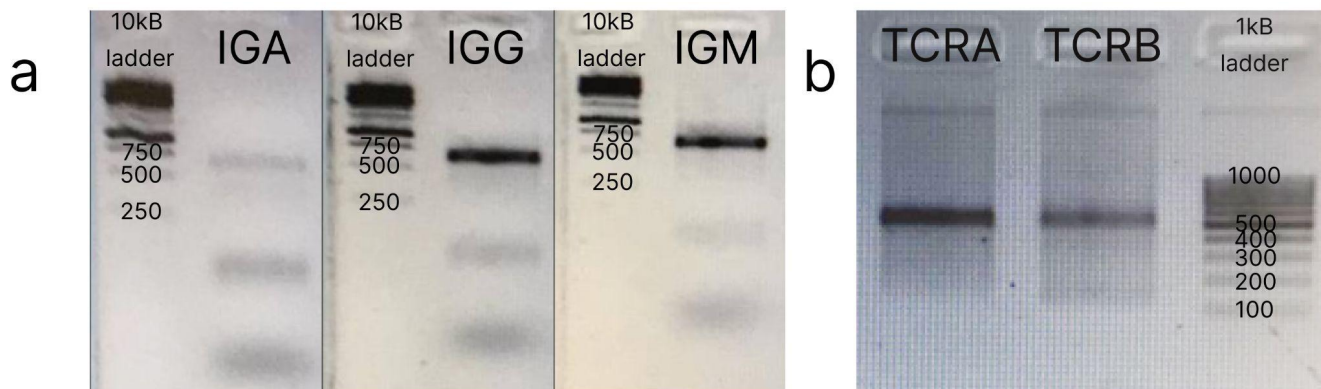


Рисунок 2. Электрофорез кДНК библиотек генов IGH и α и β цепей TCR в 2% агарозном геле. Длина продукта составляет около 600 п.о. А. кДНК библиотеки тяжелых цепей иммуноглобулинов. В. кДНК библиотеки генов цепей TCR.

3. Создание референса генов TCR и иммуноглобулинов слепыша

Для 10 слепышей были приготовлены полноразмерные (полностью покрывающие V ген, J ген и CDR3 регион) библиотеки кДНК TCR. Для 6 слепышей были получены полноразмерные библиотеки кДНК иммуноглобулинов. Библиотеки были секвенированы с длиной покрытия, достаточной для прочтения полной последовательности. Полученные в результате этого сиквенсы были выравнены на геном слепыша. Анализ выравниваний позволил нам определить координаты генных сегментов TCR и тяжелых цепей иммуноглобулинов. Нам удалось идентифицировать и разметить следующий набор функциональных генов: 51 ген TRAV, 45 генов TRAJ, 21 ген TRBV, 13 генов TRBJ, 2 гена TRBD, 79 генов IGHV, 6 генов IGHJ, 7 генов IGHD и 7 генов IGHC.

4. Филогенетический анализ генов TCR и иммуноглобулинов

Так как слепыш является ближайшим родственником мыши и крысы, мы провели филогенетический анализ обнаруженных генов TCR и иммуноглобулинов с ортологами у мыши и крысы.

Анализ деревьев показал, что гены TRAV, TRBV, IGHV и IGHC у мышей и крыс более родственны, чем соответствующие гены слепыша, однако большинство генов имеет своих ортологов у слепыша.

Некоторые псевдогены одного вида являлись функциональными генами у другого вида. (Рис. 3). Количество генов TRAV у слепыша было меньше, чем у мыши и крысы. Количество сегментов TRBV, TRBJ и TRBD очень схоже между тремя видами.

Мы обнаружили значительно меньшее количество генов IGHV по сравнению с мышью и крысой, в то время как остальные генные сегменты BCR присутствовали в сравнимом количестве.

Один из наиболее эволюционно древних изотипов - IGHM, представлен у слепыша двумя копиями. В тоже время в геноме слепыша отсутствует другой эволюционно консервативный ген - IGHD.

Таким образом, несмотря на филогенетическую близость слепыша к мышке и крысе, у слепыша есть отличительные особенности в составе генов TCR и иммуноглобулинов, которые могут частично определять отличия в функционировании адаптивного иммунитета этих животных.

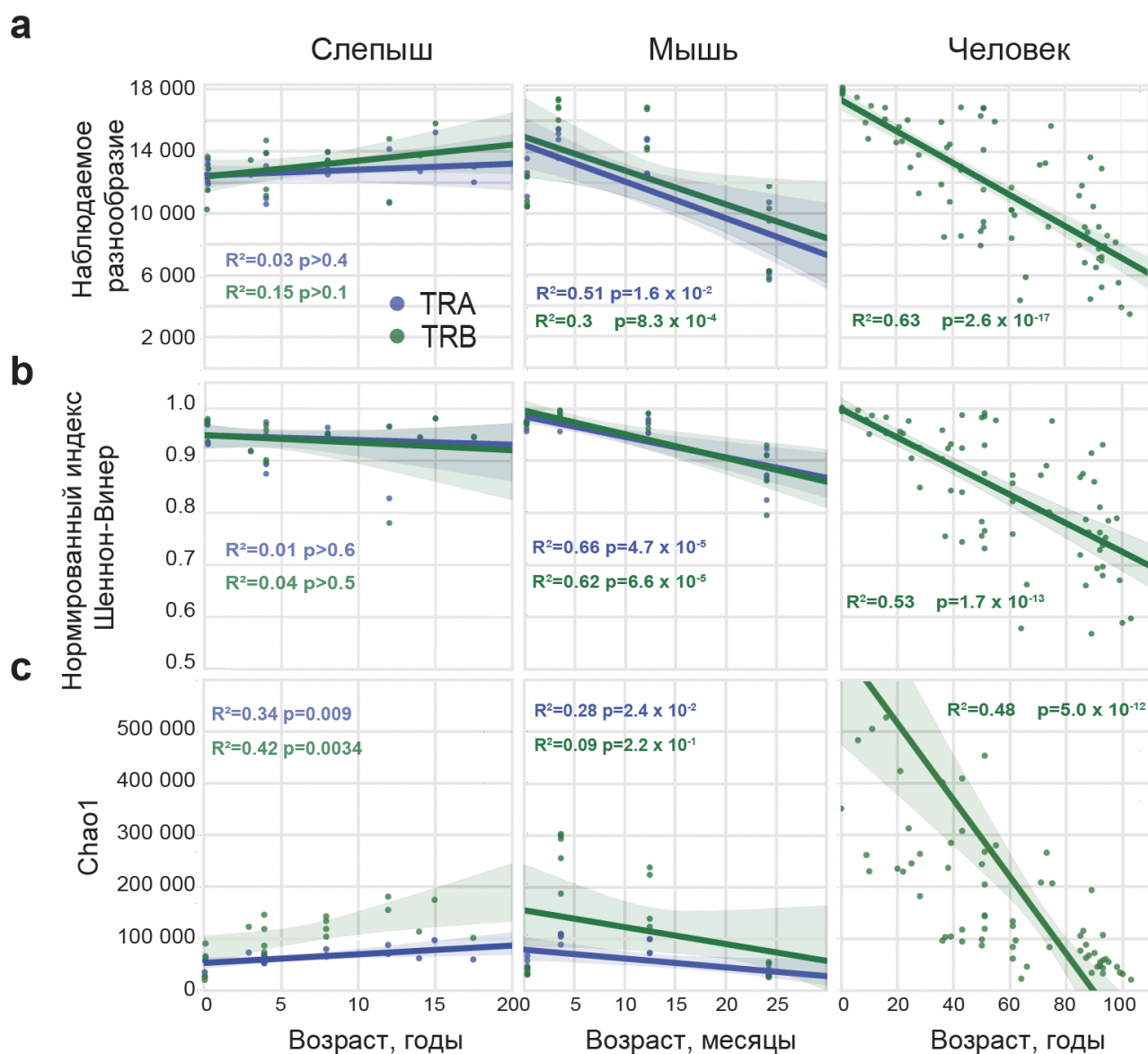


Рисунок 4. Изменение разнообразия CD3 α и β цепей TCR у слепыша, мыши и человека с возрастом. Все данные были нормализованы на одинаковое количество UMI. (a) наблюдаемое разнообразие, (b) нормализованный индекс Шеннона-Винера, (c) Chao1. Линии на графике представляют линейную регрессию рассчитанную методом наименьших квадратов. Двусторонний P-value рассчитан используя тест Вальда с t-распределением. R^2 - коэффициент детерминации. При построении графиков использовались репертуары 19 мышей, и 17 слепышей. Графики для человека были построены на ранее опубликованных репертуарах β цепи TCR.

Поскольку данные были получены с применением уникальных молекулярных баркодов (UMI), мы смогли нормализовать репертуары всех образцов на одинаковое количество исходных молекул кДНК. Как и ожидалось,

репертуары альфа и бета цепей TCR у мыши и человека снижаются с возрастом. (Рис. 4) Разнообразие TCR слепыша, напротив, оставалось постоянным независимо от возраста, при том, что изначальное разнообразие у новорожденных слепышей немного ниже, чем в образцах молодых мышей и пуповинной крови у людей. Это говорит о том, что с возрастом у слепыша не образуются крупные экспансии Т клеток.

6. МРТ тимуса слепышей разного возраста

В поисках ответа на вопрос о природе неизменного с возрастом разнообразия репертуара TCR у слепышей мы решили исследовать изменения размера тимуса с возрастом, поскольку он отвечает за продукцию части новых наивных Т-лимфоцитов.

При помощи магнитного резонанса (MRI) мы изучили размер тимуса у молодых (2-3 года) и старых (10-12 лет) особей слепыша. Ткань тимуса была подтверждена гистологически. В пределах этих двух возрастных групп мы обнаружили уменьшение размера тимуса примерно в 3.5 раза. (Рис.5). Такая динамика сочетается с данными о мыши и человеке.

Вероятно, у слепышей популяция наивных клеток поддерживается, как и у людей, за счет периферического деления наивных Т-лимфоцитов. Однако, как было показано выше, разнообразие TCR у них, в отличие от людей, с возрастом не снижается.

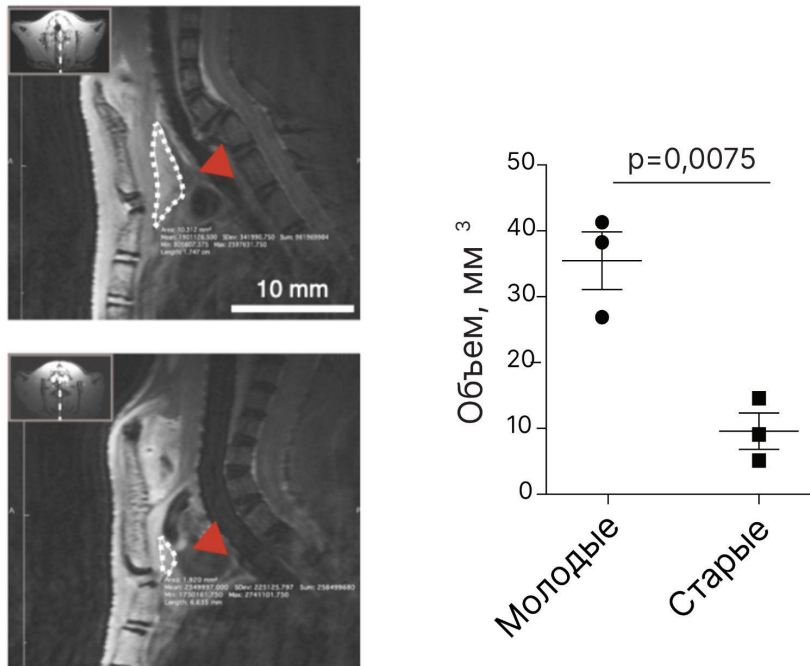


Рисунок 5. Слева, снимки МРТ тимуса молодого (сверху, возраст менее 3 лет) и старого (снизу, возраст более 9 лет) слепышей. Красной стрелкой обозначен обведенный пунктирной линией тимус. Справа, статистическое сравнение объема тимуса подсчитанного на основе снимков МРТ для 3 молодых и 3 старых особей. P-value посчитан двусторонним t-критерием Стьюдента.

7. Свойства Т-клеточного репертуара и публичные клонотипы

Мы проанализировали изменения свойства репертуара бета цепей TCR у слепыша в четырех возрастных группах (новорожденные, молодые, взрослые и старые).

Количество добавленных N нуклеотидов в молодом, взрослом и старом возрасте у слепыша больше чем у мышей и чуть меньше, чем у человека. (Рис. 6b) Теоретически из этого следует усложнение TCR репертуара, однако наблюдаемое разнообразия TCR у молодого слепыша в среднем ниже, чем у мыши. Это можно было бы объяснить конвергентной рекомбинацией, при которой высокое теоретически возможное разнообразие не реализуется в силу того, что одни последовательности клонов собираются чаще, чем другие. Если бы это было так, у слепыша должно было быть высокое количество общих (публичных) клонов. Однако, анализ публичности репертуаров CDR3β показал, что количество общих

клонов у слепышей также в среднем ниже, чем у мышей, (Рис. 6d) следовательно низкое разнообразие нельзя объяснить конвергентной рекомбинацией. Вероятно все эти наблюдения свидетельствуют о клональности наивного репертуара Т-лимфоцитов у слепыша.

8. Инвариантные Т-клетки у мышей и слепыша

Ассоциированные со слизистой оболочкой инвариантные Т-клетки (MAIT) и инвариантные клетки естественные киллеры (iNKT) представляют собой высоко консервативные между разными видами популяции Т клеток, которые экспрессируют одинаковую, или почти одинаковую, альфа цепь TCR, и распознают небольшие молекулы презентованные аналогичными MHC комплексами (MR1 и CD1). Наиболее распространенная популяция MAIT клеток у мышей и людей экспрессируют рецептор, α цепь которого образована в результате рекомбинации TRAV1 и TRAJ33a сегментов, при этом TRBV могут относиться к разным семействам .

Мы решили проверить наличие канонических инвариантных α цепей TCR у слепыша в сравнительном анализе с репертуарами мышей. Для мышей мы обнаружили наличие канонических CDR3 MAIT и iNKT. Но ни одна из этих последовательностей не была найдена среди публичных клонов слепыша.

В тоже время мы обнаружили некоторые аминокислотные последовательности CDR3 α цепей, которые были общими у обоих видов. Среди них наиболее часто встречался сегмент TRAJ40, для которого было показано, что он может являться альтернативой TRAJ33 у MR-1 реактивных Т-клеток мышей с нокаутом TRAJ33. Это может говорить о наличии ранее неописанных кросс-видовых инвариантных последовательностей α цепи TCR.

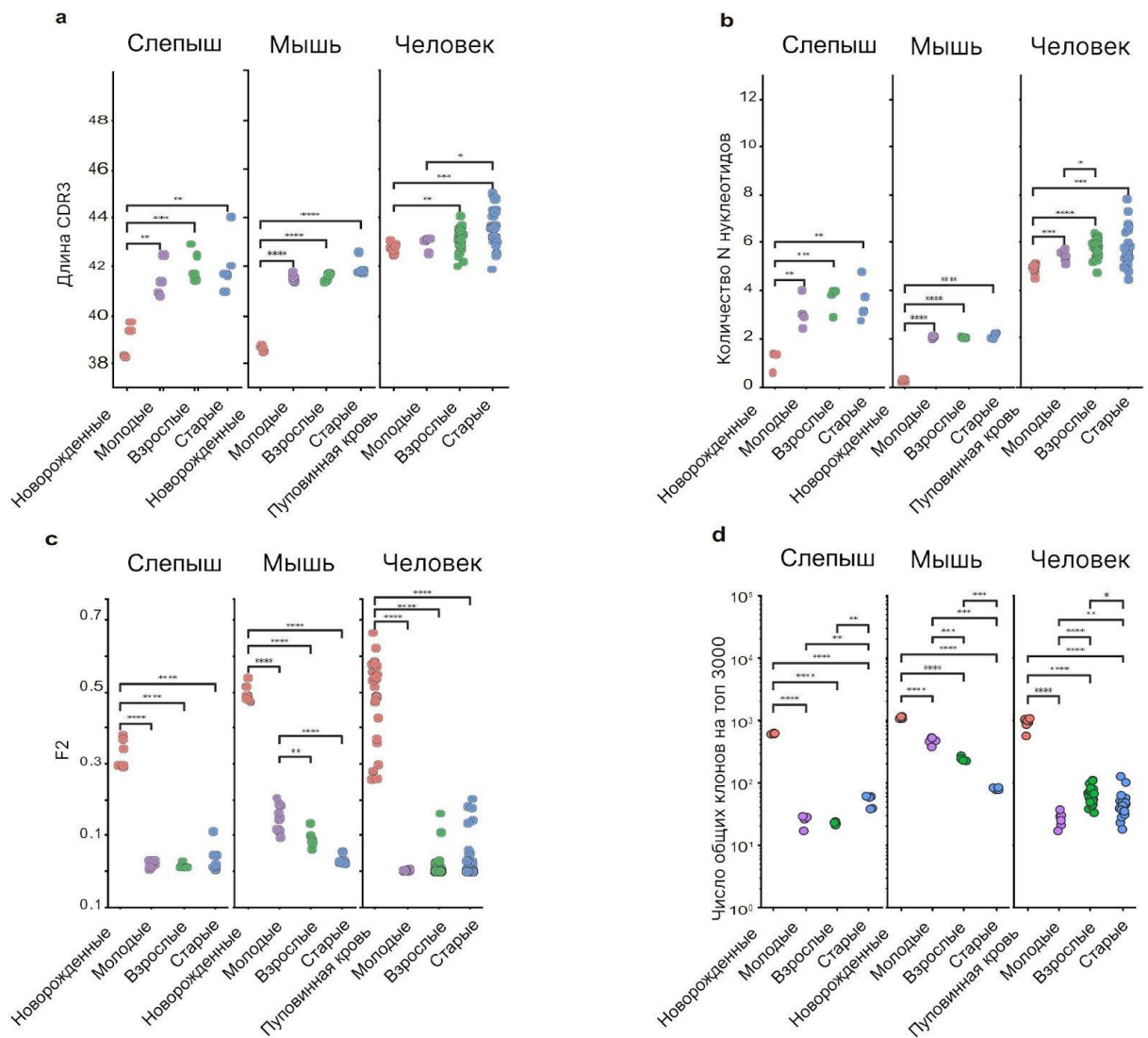


Рисунок 6. Характеристики репертуаров CDR3β цепей TCR для 4 возрастных групп слепыша, мыши и человека. (а) Средняя длина CDR3β. (б) Среднее количество добавленных N-нуклеотидов в CDR3β. (с и d) Публичность репертуаров. Для каждой пары образцов в пределах одного вида и возрастной группы мы посчитали пересечение аминокислотных последовательностей CDR3β в 3000 клонов с наиболее высокой частотой, принимая во внимание размер клонов. (с) F2 метрика - сумма средних геометрических значений частот попарно пересекающихся клонов. (d) количество общих клонов. P-value посчитан с использованием двустороннего t-критерия Уэлча (для неравных дисперсий значений). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001

9. Тестирование антител к поверхностным белкам-маркерам T и B клеточных популяций

Поскольку слепыш является не модельным объектом, его изучение затруднено отсутствием привычных видоспецифических методов исследования.

Для того чтобы исследовать популяции Т- и В-лимфоцитов по отдельности мы решили проверить работоспособность доступных антител для других близкородственных видов (мыши и крысы). Мы подобрали палитру антител к наиболее консервативным между видами эпитопам. Среди выбранных маркеров были основные маркеры Т- и В- лимфоцитов, такие как CD3, CD44, CD19, CD4, CD8a, CD8b. Используя те антитела, которые дали первичный положительный сигнал при окрашивании с последующей флуоресцентной сортировкой (FACS), мы сортировали популяции клеток, и проанализировали их транскриптом. Как оказалось ни одно из опробованных антител не позволило нам получить целевую популяцию. Так клетки сортированные с использованием Т-клеточных маркеров, также экспрессировали гены В-клеток на уровне транскриптома и наоборот.

Учитывая достаточно высокую консервативность последовательности генов, возможная причина - посттрансляционная модификация белков, в частности гликозилирование, которое, как было показано, активно происходит в клетках слепыша.

10. Низкий уровень дифференцировки Т-лимфоцитов слепыша

Для оценки влияния старения на Т-клеточный репертуар слепыша мы приготовили и проанализировали кДНК библиотеки транскриптомов клеток селезенки слепыша и мыши в четырех возрастных группах. В молодых и взрослых особях, экспрессия генов *Cd3d* и *Cd3e* была сравнима между видами, что предполагает сравнимое количество Т-лимфоцитов в селезенке. В старости, как у мыши, так и у слепыша экспрессия обоих генов снижалась, (Рис. 7) что свидетельствует о снижении количества Т-лимфоцитов в селезенке в старости, как это уже было ранее показано для мышей.

Экспрессия почти всех основных генов, отвечающих за дифференцировку в эффекторные Т-клетки (*Eomes*, *Gata3*, *Tbx21*, *FoxP3*, *Tbx21*, *Gata3*, *Rorc*), у

слепыша была на более низком уровне и не повышалась с возрастом, в отличие от мышей. (Рис. 8)

Такая характерная низкая экспрессия главных маркеров Т-клеточной дифференцировки у слепышей предполагает отсутствие долговременного Т-клеточного ответа и соотносится со стабильным уровнем разнообразия и отсутствием накопления крупных клональных экспансий с возрастом.

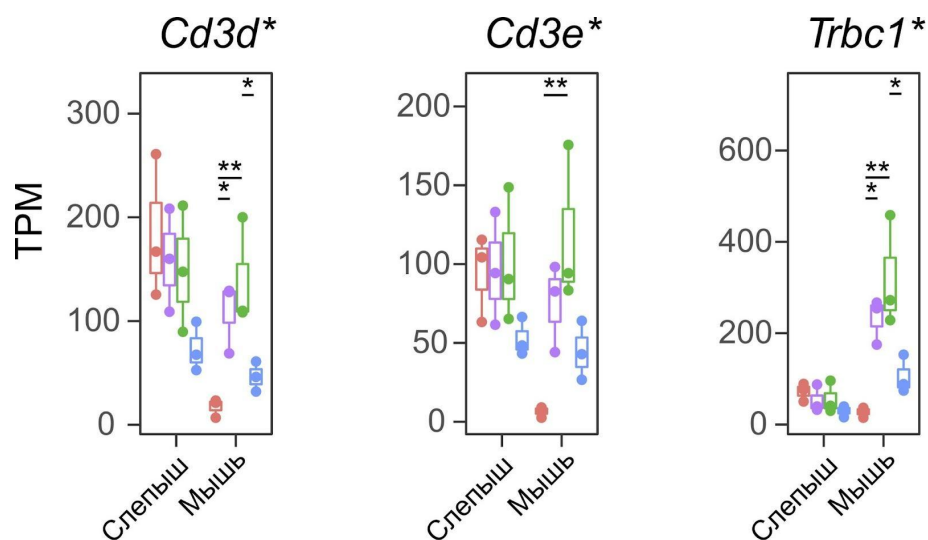


Рисунок 7. Экспрессия основных Т-клеточных генов-маркеров. Ящики показывают медиану, края отображают 25-й и 75-й процентиля, а усы определяют значения удаляющиеся не больше чем на 1.5 интерквартильных размаха от границ ящика. Цвета обозначают возрастную группу: красный - новорожденные, фиолетовый - молодые, зеленый - взрослые, синий - старые. P-value посчитан односторонним ANOVA с тестом Тьюки. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. Звездочка у названия гена означает, что экспрессия была рассчитана с использованием созданного de novo референсом. TPM - число транскриптов на миллион прочтений.

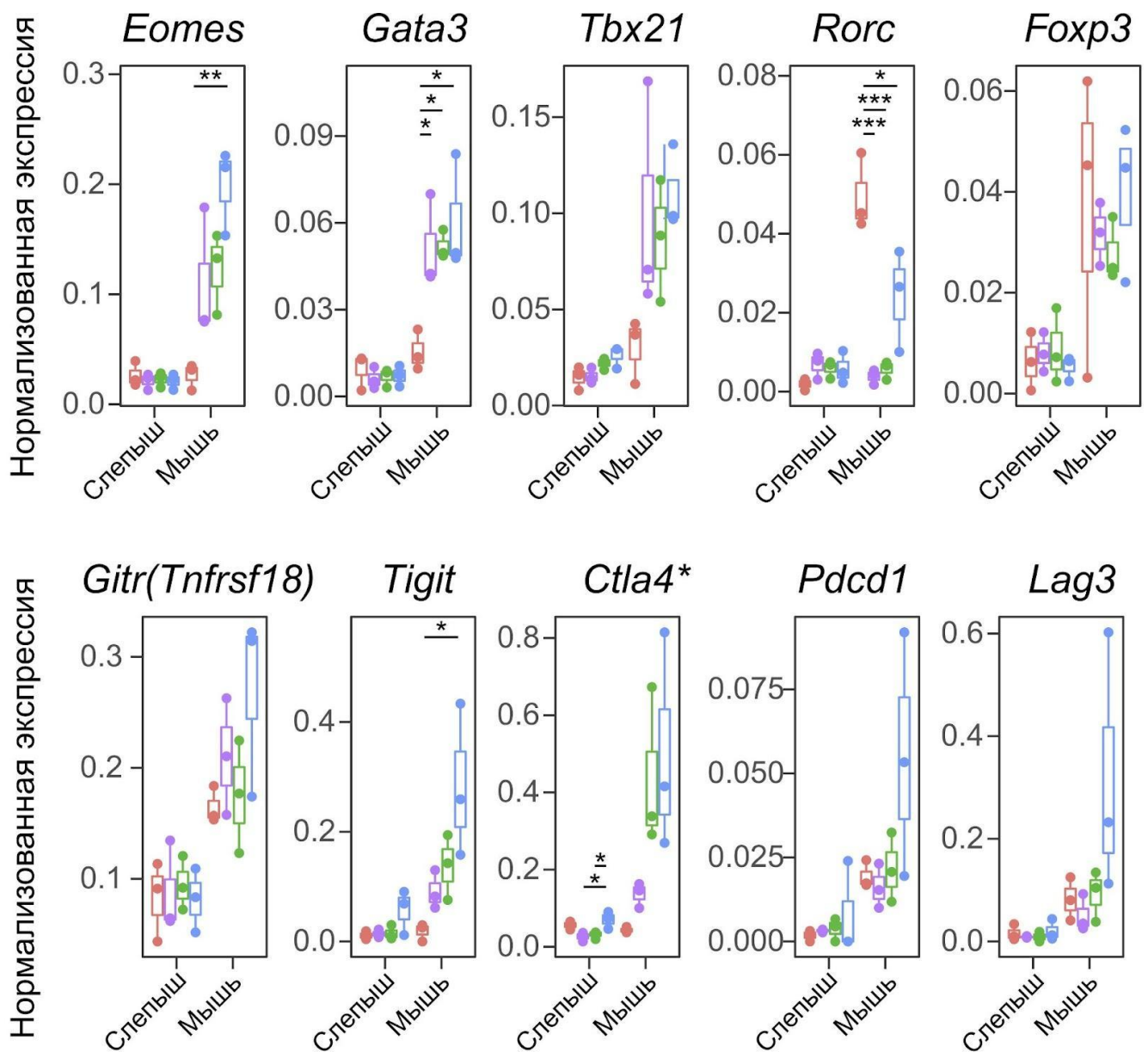


Рисунок 8. Экспрессия транскрипционных факторов Т-клеток, молекул контрольных точек и генов, экспрессия которых характерна для наивных Т-клеток. Цвета обозначают возрастную группу: красный - новорожденные, фиолетовый - молодые, зеленый - взрослые, синий - старые. P-value посчитан односторонним ANOVA с тестом Тьюки. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. Звездочка у названия гена означает, что экспрессия была рассчитана с использованием созданного de novo референсом. Исходно подсчитанный уровень экспрессии в TPM нормализован на среднее значение суммы экспрессий генов *Cd3d*, *Cd3e* и *Trbc1* выраженных в TPM.

11. Экспрессия цитокинов и цитокиновых рецепторов

Сравнительный анализ транскриптома слепышей и мышей показал, что интерлейкины и соответствующие рецепторы, которые отвечают за пролиферацию и дифференцировку Т-клеток, экспрессируются у слепыша на низком уровне и их экспрессия не меняется с возрастом. (Рис. 9)

В тоже время, экспрессия IL-7, участвующего в поддержании Т-клеточного гомеостаза и способствующего пролиферации наивных Т-клеток без дифференциации в клетки памяти, была выше у слепыша, чем у мыши. Более того, экспрессия рецептора Il7r у спалакса значительно росла с возрастом (Рис.10). Также мы наблюдали повышенную экспрессию IL-10 у слепыша по сравнению с мышью, что может свидетельствовать об ингибировании Th1 дифференциации.

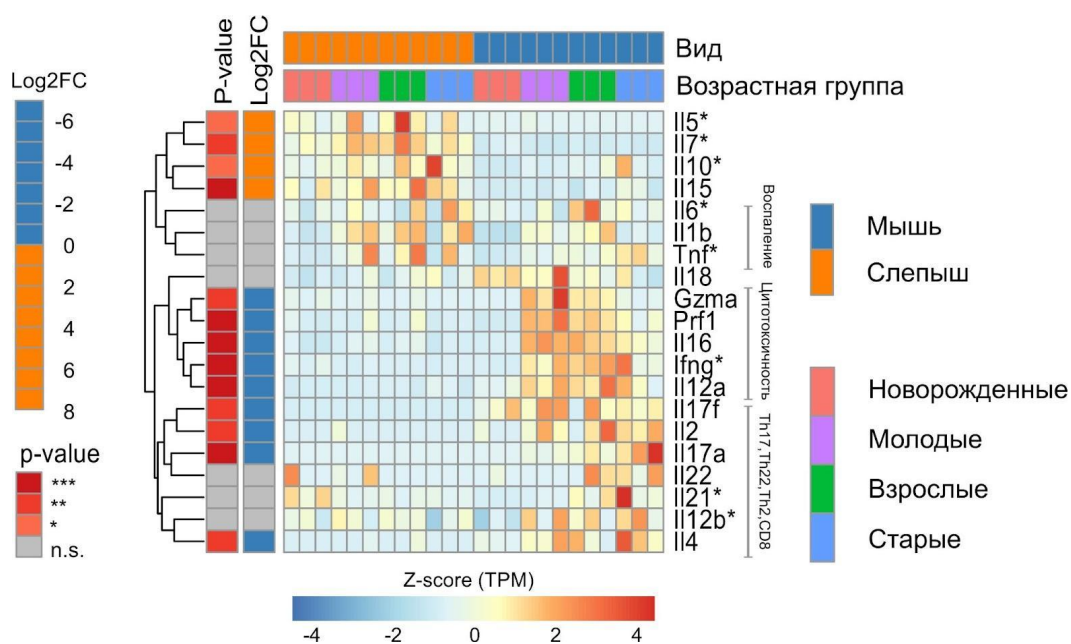


Рисунок 9. Тепловая карта экспрессии базовых цитокинов. Карта построена на основе данных транскриптома слепышей и мышей разных возрастных групп (по 3 особи в каждой группе). Цвет ячеек карты отражает Z-оценку значений экспрессии в TPM (количество стандартных отклонений от среднего значения экспрессии выбранных генов в образце). P-value и Log2FC значения показывают разницу в экспрессии генов между двумя видами. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. NS, не достоверное изменение. Для генов отмеченных звездочкой был использован новый референс, как описано в главе 'Материалы и методы'.

Кроме того, нормализованная экспрессия генов характерных для наивных Т-лимфоцитов (*Ccr7* и *Lef1*) снижалась с возрастом у мышей и росла у слепыша. (Рис. 10)

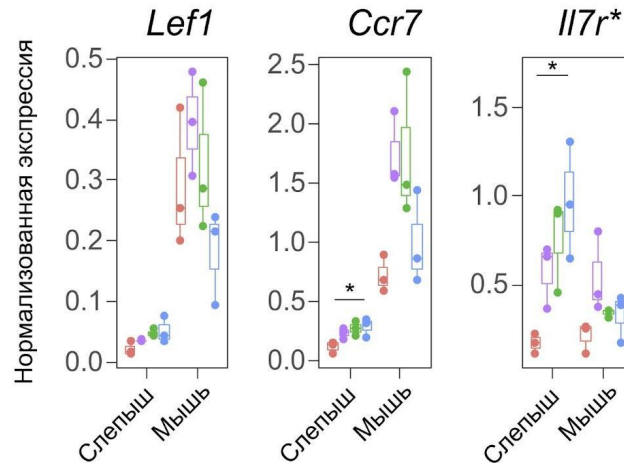


Рисунок 10. Экспрессия генов *Lef1*, *Ccr7* и *Il7r*. Исходно подсчитанный уровень экспрессии в TPM нормализован на среднее значение суммы экспрессий генов *Cd3d*, *Cd3e* и *Trbc1* выраженных в TPM. Цвета обозначают возрастную группу: красный - новорожденные, фиолетовый - молодые, зеленый - взрослые, синий - старые. P-value посчитан односторонним ANOVA с тестом Тьюки. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. Для генов отмеченных звездочкой был использован новый референс, как описано в главе ‘Материалы и методы’.

Все вышеперечисленные наблюдения, подтверждают теорию о том, что для иммунной системы слепыша скорее всего не характерно формирования долгоживущих клональных популяций дифференцированных Т-лимфоцитов, в том числе цитотоксических Т-клеток. И в тоже время эти данные указывают на гомеостаз популяции наивных Т-клеток с возрастом у слепыша.

12. Особенности свойств репертуара иммуноглобулинов

В данных репертуаров иммуноглобулинов у мышей мы ожидаемо увидели преобладание IgM начиная с рождения, затем частота этого изотипа постепенно уменьшается уступая IgG и IgA в старом возрасте. (Рис.11) Напротив, у слепыша экспрессия IgG достигает пика уже в раннем возрасте и этот изотип преобладает на

протяжении всей оставшейся жизни. Доля IgG у молодых слепышей сравнима с мышью в возрасте 2х лет.

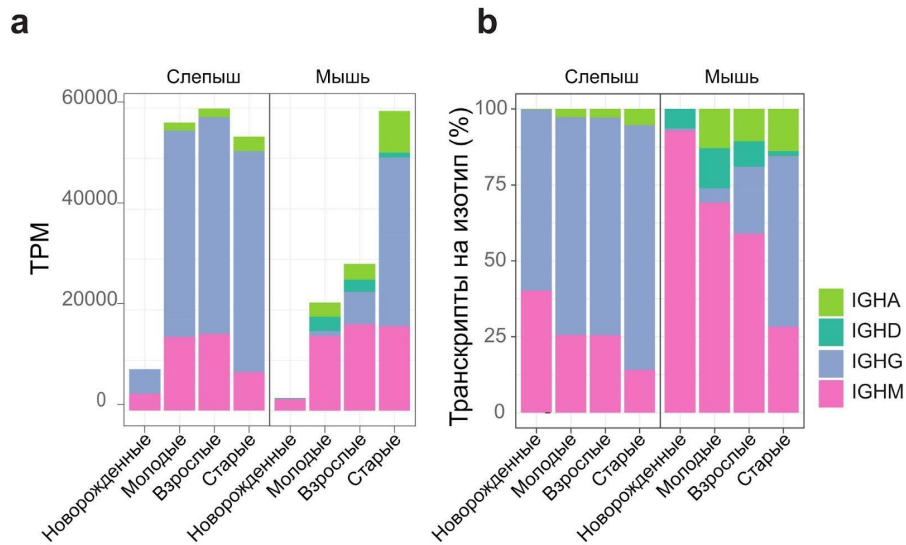


Рисунок 11. Уровень экспрессии и доля изотипов иммуноглобулинов на основе анализа данных транскриптома. TPM - число транскриптов на миллион п.о. Каждая возрастная группа представлена 3 особями.

Мы обнаружили, что в течение жизни у мышей растет частота гипермутаций (англ. *somatic hypermutation, SHM*) в репертуарах иммуноглобулинов IgA и IgG, и в меньшей степени IgM. Анализ SHM в репертуарах слепышей показал, что частота гипермутаций с возрастом у этих животных остается постоянной и даже немного снижается. (Рис. 12)

Разнообразие репертуара иммуноглобулинов IgA и IgG у мышей растет с возрастом, а для IgM начинает снижаться во взрослом возрасте к старости. (Рис. 13) Таким образом это указывает на накопление клонов IgM В и плазматических клеток. Так как наибольший вклад в продуцирование IgM в селезенке у мышей вносят В1 клетки, количество которых с возрастом падает, снижение разнообразия IgM может отражать снижение доли В1 клеток у мышей в старости. Разнообразие репертуара IgM у слепышей не падало с возрастом и оставалось на высоком уровне в течение всей жизни.

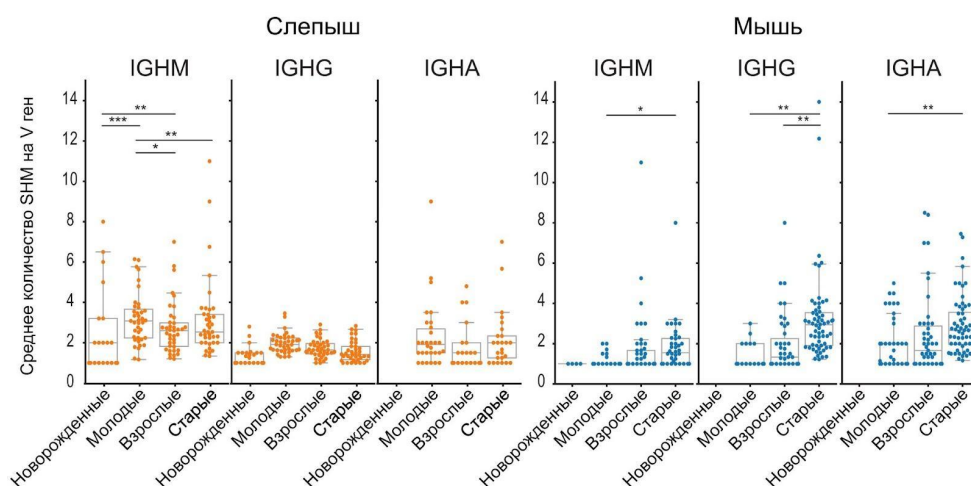


Рисунок 12. Среднее количество SHM на IGHV ген. Графики построены на основе данных секвенирования репертуара иммуноглобулинов. P-value посчитан односторонним ANOVA с тестом Тьюки. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. Ящики показывают медиану, края отображают 25-й и 75-й процентиля, а усы определяют значения удаляющиеся не больше чем на 1.5 интерквантильных размаха от границ ящика. Каждая возрастная группа представлена 3 особями.

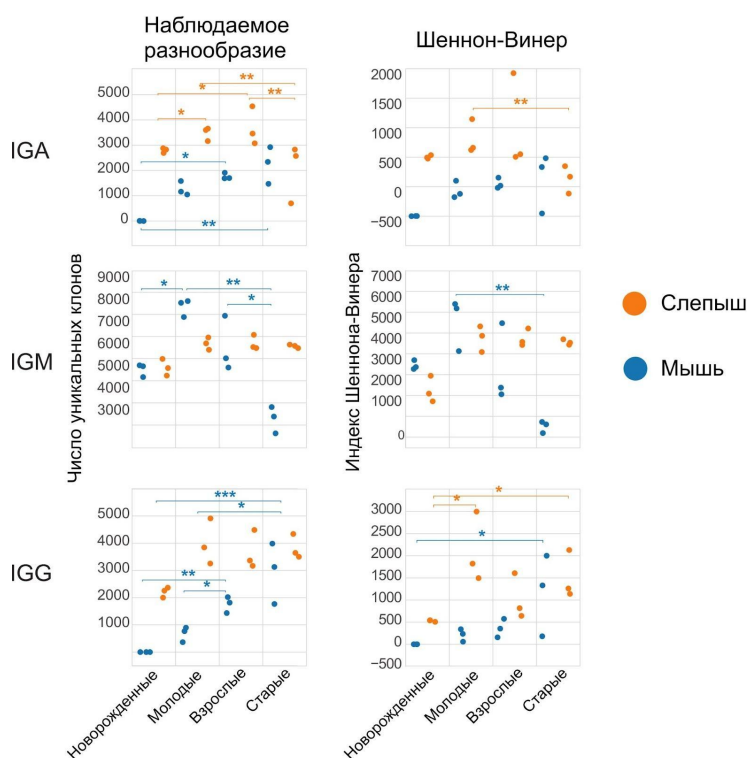


Рисунок 13. Клональность (индекс Шеннона-Винера) и разнообразие репертуара иммуноглобулинов. Каждый образец был нормирован на 10000 UMI. P-value посчитан односторонним ANOVA с тестом Тьюки. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

Выводы

1. Разработаны подходы к сравнительному анализу репертуаров иммунных рецепторов, включающие эффективную коррекцию искусственного разнообразия, образующегося в результате нуклеотидных замен в процессе ПЦР и секвенирования, количественную нормировку, позволяющую сравнивать образцы независимо от глубины секвенирования, и программный пакет для визуализации и статистической обработки характеристик иммунных репертуаров.

2. На основе технологии 5'RACE и молекулярного баркодирования (UMI) был разработан протокол получения кДНК библиотек альфа- и бета-цепей Т-клеточных рецепторов и тяжелой цепи иммуноглобулинов слепыша. С применением данного протокола мы получили и проанализировали библиотеки, на основе которых создали референсные данные генных сегментов иммунных рецепторов Т- и В-лимфоцитов для анализа иммунных репертуаров слепыша.

3. Установлено, что разнообразие репертуара Т-клеточных рецепторов (ТКР) слепыша не снижается с возрастом, в отличие от человека и мыши, в силу отсутствия накопления крупных клональных экспансий. Тимус слепыша инволюирует с возрастом и, следовательно, не может участвовать в поддержании разнообразия, которое, по всей вероятности, поддерживается за счет высокой клональности наивных Т-лимфоцитов.

4. Анализ транскриптома клеток селезенки мышей и слепышей разных возрастных групп показал, что:

- По сравнению с мышью, у слепыша пониженный и не меняющийся с возрастом уровень экспрессии генов, участвующих в дифференцировке Т-клеток (*Il2*, *Il2ra*, *Prf1*, *Ifng*, *Gzma*, *Fasl* и *Il12a*). В то же время гены анти-инфламаторных цитокинов, ингибирующих дифференцировку (*Il10*), и цитокинов, участвующих в поддержании гомеостаза наивных Т-клеток (*Il7*, *Il7r*) высоко экспрессируются у слепыша в течение всей жизни.
- Уровень экспрессии генов наивных Т-клеток (*Ccr7* и *Lef1*) с возрастом у слепыша повышен по сравнению с мышью.
- В отличие от человека и мыши, для которых характерно накопление с возрастом специализированных Т-клеточных популяций, регулируемых транскрипционными факторами *Eomes*, *Gata3*, *Tbx21* и *Foxp3*, их низкая экспрессия у слепыша указывает на незначительную аккумуляцию функциональных Т-клеточных популяций у старых особей.
- У слепыша с возрастом не наблюдается повышения экспрессия *Foxp3* и *Ctla4*, что свидетельствует об отсутствии экспансии регуляторной популяции Т-клеток (Treg) и, таким образом, необходимости в регуляции “ошибочно отвечающих” на антигенную стимуляцию клональных экспансий Т-лимфоцитов, которые обычно накапливаются у других организмов с возрастом.

Эти наблюдения предполагают гомеостаз наивных Т-клеток с возрастом и свидетельствуют об отсутствии у слепыша долговременной Т-клеточной памяти и активной дифференцировки в специализированные Т-клеточные популяции.

5. Анализ гуморального иммунитета слепыша показал отсутствие увеличения частоты гипермутаций в генах иммуноглобулинов с возрастом. IgG достигает пика уже в раннем возрасте, и этот изотип доминирует на протяжении всей жизни. Мы установили, что, в отличие от мыши и человека, разнообразие IgM остается стабильным в течении жизни у слепыша, что может указывать на устойчивое присутствие популяции наиболее ранних фетальных В1-клеток, способных активироваться независимо от Т-лимфоцитов. Эти данные показывают, что также, как и в случае клеточного иммунитета, гуморальный иммунитет идет по пути отсутствия формирования более специализированного иммунного ответа.

6. Канонических последовательностей CDR3 α цепи TCR, характерных для популяций MAIT и iNKT клеток мыши в репертуаре слепыша не обнаружено. Однако повышенная частота использования TRAJ40 среди публичных Т-клонотипов в репертуаре слепыша указывает на наличие ранее неописанных инвариантных популяций Т-клеток.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации

1. **Izraelson M**, Metsger M, Davydov AN, Shagina IA, Dronina MA, Obratsova AS, Miskevich DA, Mamedov IZ, Volchkova LN, Nakonechnaya TO, Shugay M, Bolotin DA, Staroverov DB, Sharonov GV, Kondratyuk EY, Zagaynova EV, Lukyanov S, Shams I, Britanova OV, Chudakov DM (2021). Distinct organization of adaptive immunity in the long-lived rodent *Spalax galili*. *Nat Aging* 1 (2), 179–189
2. **Izraelson M**, Nakonechnaya TO, Moltedo B, Egorov ES, Kasatskaya SA, Putintseva EV, Mamedov IZ, Staroverov DB, Shemiakina II, Zakharova MY, Davydov AN, Bolotin DA, Shugay M, Chudakov DM, Rudensky AY, Britanova OV (2017). Comparative analysis of murine T-cell receptor repertoires. *Immunology* 153 (2), 133–144
3. Britanova OV, Shugay M, Merzlyak EM, Staroverov DB, Putintseva EV, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Pogorelyy MV, Bolotin DA, **Izraelson M**, Davydov AN, Egorov ES, Kasatskaya SA, Rebrikov DV, Lukyanov S, Chudakov DM (2016). Dynamics of individual T Cell repertoires: From cord blood to centenarians. *J Immunol* 196 (12), 5005–5013
4. Bagaev DV, Zvyagin IV, Putintseva EV, **Izraelson M**, Britanova OV, Chudakov DM, Shugay M. VDJviz: a versatile browser for immunogenomics data. *BMC Genomics*. 2016 Jun 13;17:453. doi: 10.1186/s12864-016-2799-7. PMID: 27297497; PMCID: PMC4907000.

Конференции и семинары:

1. 5th European Congress of Immunology. Устный доклад: “T cell immunity does not age in a long-lived rodent species”, Amsterdam, Netherlands. Abstract has been published., September 2018