

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Британова Ольга Владимировна

Научный консультант:

доктор биологических наук, член-корреспондент РАН

Чудаков Дмитрий Михайлович

Москва 2022

Оглавление

1. Введение	4
2. Обзор литературы	6
2.1. Адаптивный иммунитет	6
2.2. Т-клеточный иммунитет	7
2.2.1. Структура Т-клеточного рецептора	7
2.2.2. Структура молекул МНС	8
2.2.3. Локус TCR и V(D)J рекомбинация	10
2.2.4. Созревание и селекция Т-клеток	13
2.2.5. Активация и последующая дифференциация Т-клеток	17
2.2.6. Субпопуляции клеток Т-хелперов	19
2.3. В-клеточный иммунитет	22
2.3.1. Структура В-клеточного рецептора и антитела	22
2.3.2. Антигенсвязывающий участок BCR и антител	24
2.3.3. Локус BCR и формирование В-клеточного репертуара	24
2.3.4. Созревание и селекция В-клеток	26
2.3.5. Активация и последующая дифференциация В-клеток	27
2.3.6. Классы антител	31
2.3.7. В1 клетки	31
2.3.8. В2-клетки	32
2.3.9. Регуляторные В-клетки (Breg).	32
2.4. Иммунологическая память	33
2.4.1. В-клеточная память	33
2.4.2. Т-клеточная память	34
2.5. Возрастные изменения адаптивного иммунитета	36
2.5.1. Т-клетки	36
2.5.2. В-клетки	41
2.6. Изучение иммунитета на немодельных организмах	43
2.6.1. Летучие мыши	43
2.6.2. Рыбы (<i>Gadus morhua</i>)	44
2.6.3. Голый землекоп (<i>Heterocephalus glaber</i>)	44
2.7. Слепыш (<i>Spalax galili</i>)	46
3. Цели и задачи	48
4. Материалы и методы	49
4.1. Животные	49
4.2. Магнитно-резонансная томография	49

4.3. Выделение РНК	50
4.4. Приготовление кДНК библиотек альфа- и бета-цепи TCR и IGH	51
4.4.1. Синтез первой цепи кДНК	51
4.4.2. Первый раунд ПЦР-амплификации кДНК библиотек	53
4.4.3. Второй раунд ПЦР-амплификации	54
4.5. Секвенирование библиотек TCR и иммуноглобулинов	56
4.6. Сравнение метрик разнообразия репертуара TCR	56
4.7. Анализ TCR репертуаров	56
4.8. Анализ публичности репертуара TCR	57
4.9. Анализ репертуара тяжелых цепей иммуноглобулинов	58
4.10. Сборка de novo транскриптома слепыша	58
4.11. Получение кДНК библиотек транскриптома	59
5. Результаты	61
5.1. Подбор метода оценки разнообразия иммунных репертуаров	62
5.2. Разработка метода получения кДНК библиотек альфа- и бета-цепей TCR и тяжелых цепей иммуноглобулинов (IGH) слепыша	64
5.3. Создание референса генов TCR и иммуноглобулинов слепыша	68
5.4. Филогенетический анализ генов TCR и иммуноглобулинов	69
5.5. Разнообразие TCR у слепыша не меняется с возрастом	71
5.6. Тимус слепыша инволюционирует с возрастом	72
5.7. Свойства Т-клеточного репертуара и публичные клонотипы	74
5.8. Инвариантные Т-клетки у мышей и слепыша	76
5.9. Тестирование антител к поверхностным маркерам Т- и В-клеточных популяций	78
5.10. Низкий уровень дифференцировки Т-лимфоцитов у слепыша	81
5.11. Экспрессия цитокинов и цитокиновых рецепторов	84
5.12. Репертуар иммуноглобулинов	88
6. Выводы	93
7. Заключение	96
8. Список сокращений	98
9. Список работ, опубликованных по теме диссертации	100
10. Список литературы	101
11. Приложение	119
12. Благодарности	135

1. Введение

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 количества 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 [1].

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 и сравнили динамику

изменения экспрессии основных генов, отвечающих за функционирование, регуляцию и дифференциацию различных популяций лимфоцитов.

Настоящая работа помогает пролить свет на механизмы, частично отвечающие на вопрос о природе долгожительства *Spalax galili*.

2. Обзор литературы

2.1. Адаптивный иммунитет

Адаптивный иммунитет является частью иммунной системы и помогает организму бороться с патогенами. В отличие от врожденного иммунитета, который отвечает за защиту от большого predetermined спектра патогенов, адаптивный иммунитет обладает высокой специфичностью к конкретному патогену, попавшему в организм. Адаптивный иммунитет формирует иммунологическую память после первичной реакции на патоген и приводит к усиленной реакции при повторном заражении тем же патогеном. Функции адаптивного иммунитета главным образом лежат на двух типах лимфоцитов: В-клетки и Т-клетки. Эти клетки экспрессируют на своей поверхности В- и Т-клеточные рецепторы. До встречи с патогеном эти клетки проявляют мало функциональной активности и называются наивными. При встрече с патогеном происходит их активация, и клетки дифференцируются в полностью функционально-активные эффекторные лимфоциты.

Т- и В-клеточные лимфоциты различаются структурой антиген-специфичных рецепторов и типом антигенов, которые они распознают. В-клетки связывают свободно плавающие антигены различной химической природы. Т-клетки распознают антиген в форме пептида и только в том случае, если он связан с молекулой главного комплекса гистосовместимости (англ. *major histocompatibility complex*, *МНС*) на поверхности зараженной клетки.

После того, как В-клеточный рецептор связался с антигеном, В-клетка становится плазматической клеткой (это эффекторная форма В-лимфоцитов). Плазматические клетки секретируют антитела, которые представляют собой водорастворимую форму В-клеточного рецептора (англ. *B-cell receptor*, *BCR*) и обладают такой же специфичностью, как и мембранный рецептор плазматической клетки. Таким образом, антиген, который активирует В-клетку, становится мишенью для продуцируемых ею антител.

Т-клетка при контакте с антигеном пролиферирует и дифференцируется в один из функциональных типов эффекторных Т-лимфоцитов. Цитотоксические Т-лимфоциты убивают клетки, пораженные вирусом или другим внутриклеточным патогеном. Хелперные Т-лимфоциты способствуют активации других клеток, и в частности дают сигнал В-лимфоцитам продуцировать антитела. Регуляторные Т-клетки (англ. *regulatory T-cells, Treg*) подавляют активность других лимфоцитов. У Т-клеточного рецептора (англ. *T-cell receptor, TCR*) нет водорастворимой формы.

Эффекторные Т- и В-лимфоциты могут дифференцироваться в клетки памяти, обеспечивая долговременную иммунологическую память. При повторном заражении тем же патогеном, такие клетки быстро дифференцируются обратно в эффекторные.

2.2. Т-клеточный иммунитет

2.2.1. Структура Т-клеточного рецептора

Каждая Т-клетка несет на своей поверхности большое количество идентичных TCR. Каждый рецептор состоит из двух полипептидных цепей: TCR- α и TCR- β (Рис. 1). Каждая цепь состоит из двух иммуноглобулиновых доменов, между собой цепи соединяются за счет дисульфидной связи. Каждая цепь имеет переменный домен (V) и константный домен (C). Цепь пронизывает мембрану гидрофобным доменом и заканчивается коротким цитоплазматическим хвостом с внутренней стороны мембраны. Переменные домены α - и β -цепей образуют карман, состоящий из трех пептидных петель, которые называются CDR (англ. *complementarity determining region, CDR*). Каждая цепь из двух имеет CDR1, CDR2 и CDR3, и в месте контакта эти 6 участков образуют антиген-распознающий карман. CDR обладают высокой вариативностью между разными клетками, что обеспечивает возможность распознавать множество различных антигенов. Наибольшим разнообразием последовательности обладает CDR3 регион.

Настоящее полное разнообразие TCR не установлено, однако на данный момент считается, что у одного человека оно составляет минимум 100 млн разных клонотипов [2]. При этом оценки теоретически возможного разнообразия репертуара TCR варьируются в пределах от 10^{20} [3] до 10^{61} вариантов пар $\alpha - \beta$ цепей TCR[4].

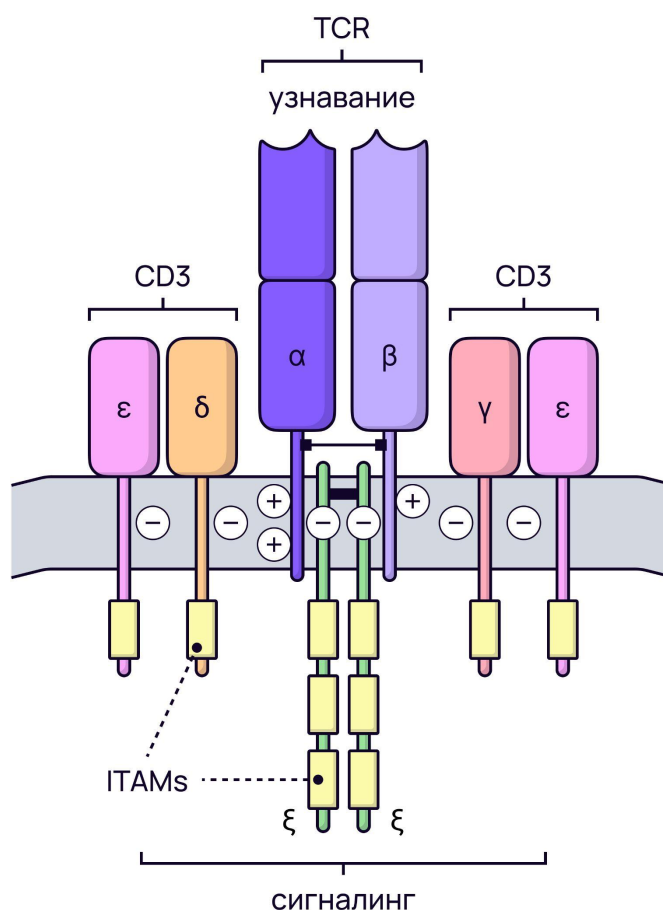


Рисунок 1. Структура T-клеточного рецептора и корецептора CD3.

2.2.2. Структура молекул МНС

T-клетки узнают антиген в комплексе с молекулами МНС. Когда вирус поражает клетку, внутри начинается экспрессия вирусных белков. Часть этих белков, так же как и родных белков клетки, процессируется и нарезается на короткие пептиды длиной 8-10 аминокислот. Эти пептиды презентуются на поверхности клетки молекулами МНС. Есть два класса МНС. (Рис. 2)

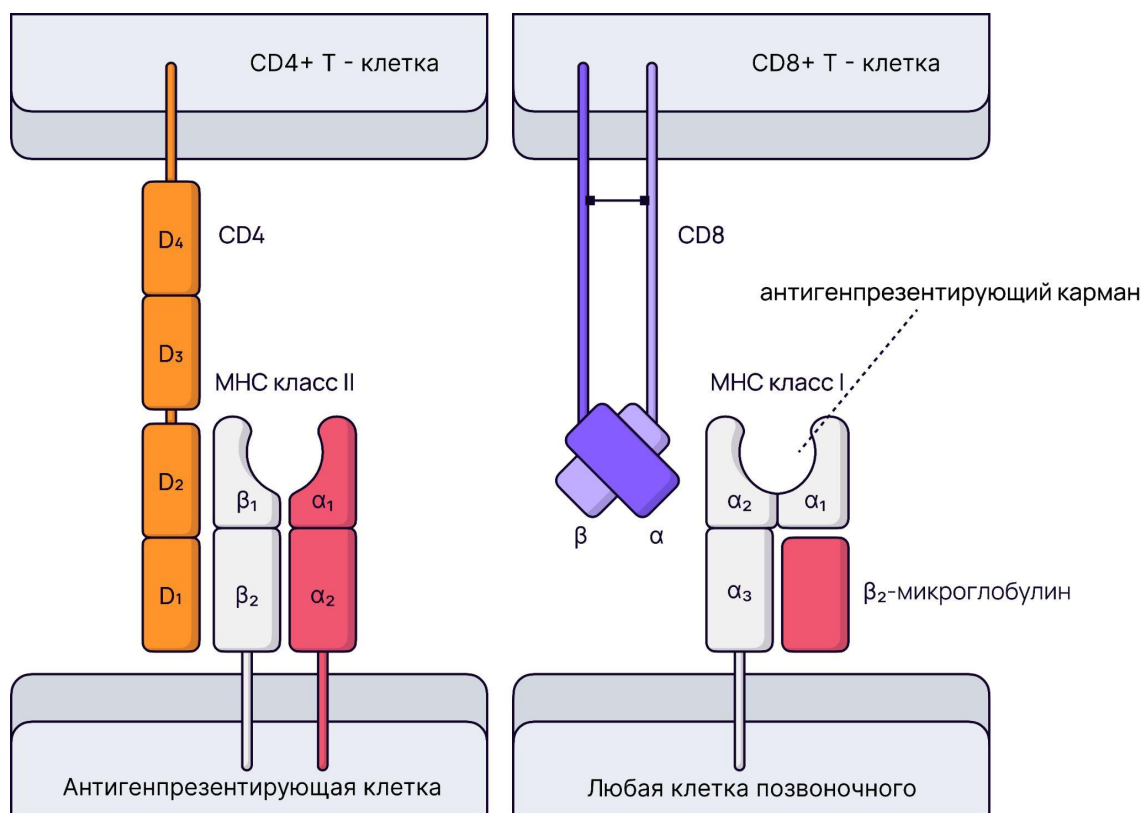


Рисунок 2. Взаимодействие Т-клеток с молекулами МНС I и II классов.

МНС I состоит из двух полипептидных цепей: α цепь, в которой выделяют три домена, и β_2 -микроглобулин. α_3 домен вместе с микроглобулином образуют структуру, похожую на иммуноглобулиновый домен. α_1 and α_2 домены образуют карман, в котором располагается пептид-антиген. МНС I экспрессируются всеми клетками млекопитающих.

МНС II состоит из двух цепей: α и β , которые не связаны ковалентно друг с другом. α_1 и β_1 домены образуют схожий по форме с МНС I антигенпрезентирующий карман. Однако края этого кармана более открыты, что позволяет молекуле МНС II связывать более длинные пептиды (13-17 аминокислот). Молекулы МНС II экспрессируются на поверхность антигенпрезентирующих клеток (англ. *antigen-presenting cell*, APC), включая дендритные клетки, макрофаги и В-клетки.

Гены, кодирующие МНС I и МНС II, имеют большое количество аллельных вариантов в популяции, что определяет разнообразный паттерн презентруемых пептидов в клетках разных организмов.

2.2.3. Локус TCR и V(D)J рекомбинация

В ходе созревания Т-лимфоцитов, локус, в котором находятся кодирующие гены TCR, проходит через процесс V(D)J рекомбинации. У незрелых лимфоцитов локусы α - и β -цепей TCR перестроены и имеют схожую структуру. Локус α -цепи состоит из нескольких V, нескольких J и одного C сегмента, локус β -цепи состоит из нескольких V, двух D, нескольких J и двух C сегментов. (Таб.1) В состав α - и β -цепей зрелого рецептора входят по одному сегменту каждого типа. Это достигается в процессе V(D)J рекомбинации, когда в локусе α - и β -цепи удаляется участок ДНК с “лишними” сегментами, и конкретный V соединяется с конкретным J (у β -цепи V с D, и D с J) (Рис. 3).

Участки CDR1 и CDR2 закодированы в V сегменте, тогда как участок CDR3, обладающий наибольшим разнообразием, кодируется в месте стыка сегментов, начиная с конца V и заканчиваясь в начале J. Обладая высокой степенью разнообразия последовательности, CDR3 вносит наибольший вклад в распознавание антигена TCR [5].

В геноме незрелых Т-лимфоцитов гены-сегменты располагаются кассетами, как показано на рисунке 3. Каждый сегмент фланкирован сигнальной последовательностью рекомбинации (англ. *recombination signal sequences, RSS*). Эта последовательность направляет процесс V(D)J рекомбинации. Каждый RSS состоит из консервативного участка длиной 7 нуклеотидов (гептамер), затем следует не консервативный участок (спейсер) длиной 12 или 23 нуклеотида, и еще один консервативный участок длиной 9 п.о. (нонамер) (Рис. 4).

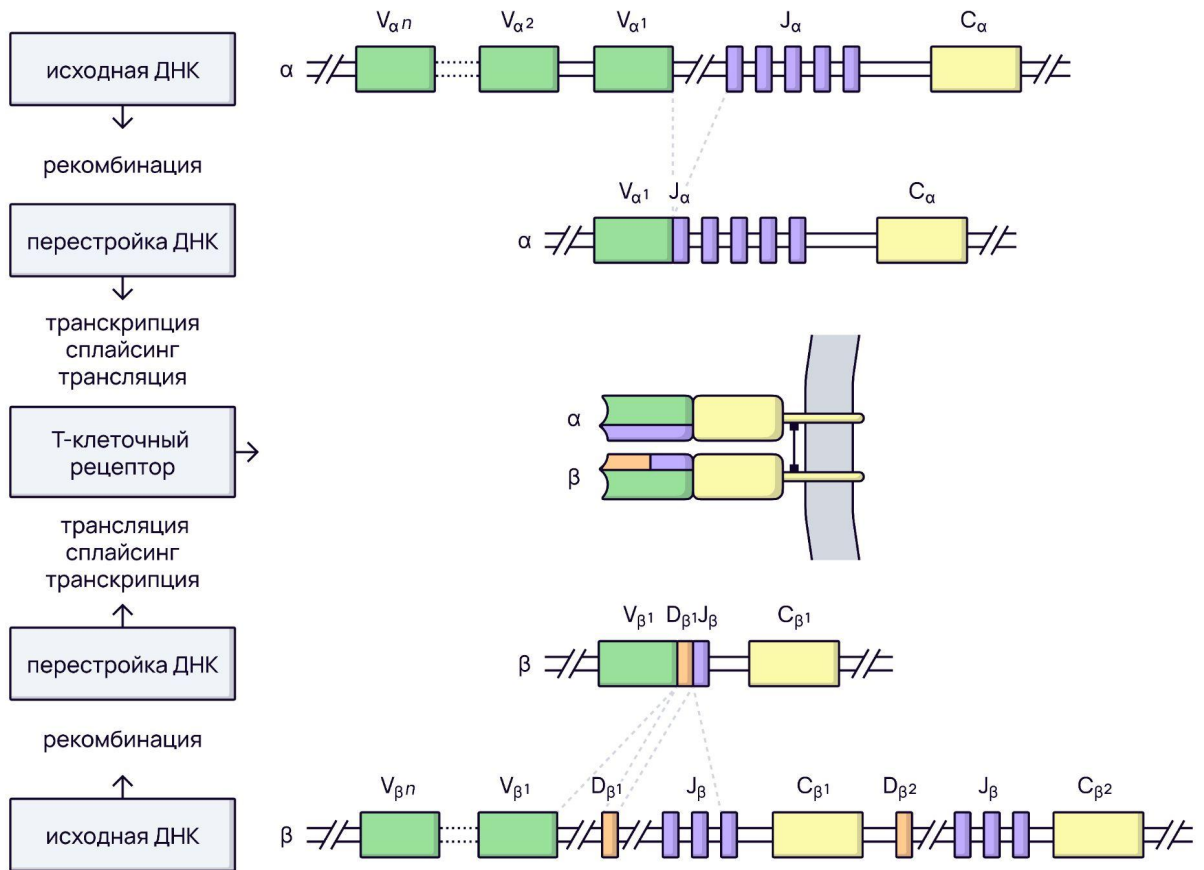


Рисунок 3. Схема V(D)J-рекомбинации α - и β -цепей Т-клеточного рецептора. Цветами показаны гены-сегменты, а также соответствующим цветом показано примерное расположение участков полипептидных цепей димера TCR, соответствующих конкретным генным сегментам. Зеленым цветом показаны V сегменты, оранжевым - D сегменты, фиолетовым - J сегменты, желтым - C сегменты.

Таблица 1. Количество сегментов в локусе TCR у мыши и человека [6]

Сегмент	Homo sapiens		Mus Musculus	
	TRA	TRB	TRA	TRB
V	54	76	98	35
D	0	2	0	2
J	61	14	60	14
C	1	2	1	2

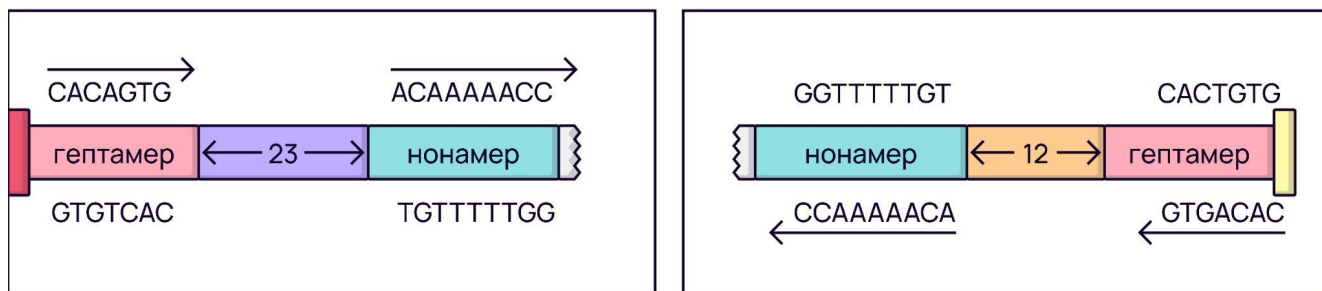


Рисунок 4. Устройство RSS

RSS вплотную прилегает к кодирующей последовательности каждого сегмента. V гены всегда фланкированы RSS с длиной спейсера 23 нуклеотида, J гены фланкированы RSS с последовательностью 12 нуклеотидов. D сегмент фланкирован с двух сторон обоими вариантами RSS.

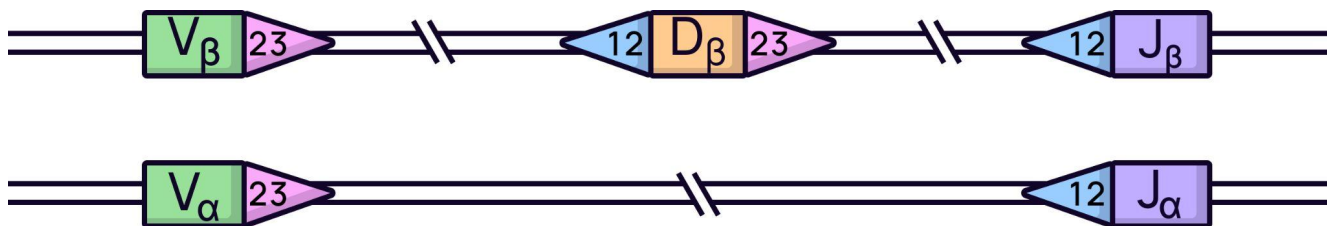


Рисунок 5. Распределение RSS со спейсерами разной длины в генах-сегментах α - и β -цепей TCR.

Рекомбинация происходит по правилу 12/23, согласно которому сегменты, фланкированные RSS со спейсером в 23 нуклеотида, могут соединяться только с сегментами, фланкированными RSS с длиной спейсера 12 нуклеотидов. Такая организация определяет направление рекомбинации и не допускает неправильно соединенных сегментов.

Вначале рекомбинации белки RAG-1 и RAG-2 (англ. *recombination activating genes*), которые распознают и связывают RSS. Эти белки пространственно сближают участки рекомбинации, вносят двухцепочечные разрывы ДНК на концах сегментов и ковалентно связывают шпилькой две цепи ДНК друг с другом в месте разрыва. Затем белки Ku70 и Ku80 распознают двухцепочечный разрыв, а белок Artemis раскрывает шпильку, внося одноцепочечный разрыв в произвольном

месте, в результате чего возникает вариабельность последовательности, а последовательность нуклеотидов, образованная в результате раскрытия шпильки, называется Р-нуклеотидами. Далее одноцепочечные концы модифицируются путем удаления случайного числа нуклеотидов белками репарации ДНК и добавлением случайных нуклеотидов (N) терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой (TdT). Этот процесс случайного удаления и добавления нуклеотидов приводит к возникновению новых последовательностей в месте сочленения сегментов.

Есть различия в активности TdT у мышей и людей. Для мышей было показано, что TdT начинает экспрессироваться только после рождения [7]. Это приводит к тому, что Т- и В-клеточные рецепторы, сформированные в этот период, не имеют N-нуклеотидов. По некоторым данным [8] эти клетки могут сохраняться длительное время в кровотоке в течение жизни, и их можно детектировать в репертуаре взрослых особей.

У людей экспрессия TdT начинается на ранних стадиях развития зародыша, однако количество добавленных нуклеотидов в этот период ниже, чем у взрослого человека. Интересно, что в тех лимфоцитах плода, где все же произошло добавление N-нуклеотидов во время рекомбинации, наблюдается использование более коротких D сегментов, что предполагает наличие селекции по размеру CDR3 в этот период развития [9]. После работы TdT, ДНК лигаза IV типа соединяет концы сегментов, восстанавливая целостность хромосомы. Поскольку итоговое количество нуклеотидов в месте контакта ничем не определено, иногда в результате рекомбинации может произойти сдвиг рамки считывания, или возникнуть стоп-кодон, что приведет к появлению нефункционального TCR.

2.2.4. Созревание и селекция Т-клеток

Предшественники Т-лимфоцитов - плюрипотентные гемопоэтические стволовые клетки костного мозга. Вместе с кровотоком эти клетки попадают в тимус, где они становятся тимоцитами - развивающимися Т-лимфоцитами. В

тимусе происходят последующая пролиферация, селекция и развитие Т-клеток, в результате чего из тимуса в кровоток выходят зрелые наивные Т-лимфоциты.

У людей при рождении тимус полностью сформирован, в то время как у мышей он продолжает развиваться еще в течение месяца после рождения. Наибольшее количество Т-лимфоцитов тимус производит в период до полового созревания, после чего он начинает медленно уменьшаться в размере, а его активность значительно сокращается. Этот процесс получил название инволюция тимуса, в результате чего ткань тимуса заменяется соединительной. После инволюции тимуса популяция наивных Т-лимфоцитов и, соответственно, разнообразие репертуара Т-клеток поддерживается за счет долгоживущих лимфоцитов, а также за счет деления зрелых Т-клеток в периферической крови.

У молодой мыши тимус содержит порядка 100 -200 млн клеток. Однако, из 50 млн новых клеток, которые появляются каждый день, лишь около 2 млн покинет тимус в виде зрелых Т-клеток. 98% тимоцитов умирают в тимусе в результате апоптоза [10].

Развитие Т-лимфоцитов в тимусе сопровождается перестройкой генов α - и β -цепей TCR, последовательной экспрессией различных транскрипционных факторов и поверхностных маркеров.

Стадии развития тимоцитов получили свое название относительно экспрессии корецепторов CD4 и CD8. Попав в тимус, тимоциты еще не экспрессируют ни один из этих маркеров, поэтому они называются двойными негативными Т-клетками (англ. “*double-negative*” *thymocytes*, DN). У DN Т-клеток можно выделить 4 стадии развития. Вначале Notch1 рецептор тимоцитов получает сигнал от его эпителиальных клеток тимуса. Это приводит к экспрессии двух транскрипционных факторов TCF1(англ. *T-cell-factor1*) и GATA3. Эти транскрипционные факторы промотируют экспрессию других транскрипционных факторов и первых поверхностных маркеров. DN1 клетки экспрессируют CD44. На этой стадии еще не происходит рекомбинации генов TCR. По мере созревания тимоциты начинают экспрессировать CD25 и становятся DN2. На этой стадии начинается рекомбинация между D- и J-генами β -цепи TCR. Затем экспрессия

CD44 снижается и клетки переходят в стадию DN3. На этой стадии происходит рекомбинация между V-геном и уже рекомбинированным участком DJ. β -цепь формирует пред-T-клеточный рецептор (англ. *pre-TCR*) в комплексе с суррогатной α -цепью (аналог α -цепи), которая кодируется геном *Ptcr α* . Кроме того, на этой стадии начинает экспрессироваться комплекс CD3. Этот комплекс необходим для передачи сигнала активации от TCR внутрь клетки. Комплекс CD3, а точнее его субъединица CD3 γ (в особенности ее внеклеточный домен), необходим TCR для экспрессии на поверхность клетки [11], таким образом, эта молекула является одним из основных маркеров T-лимфоцитов.

Клетки, где рекомбинация приводит к появлению не функциональной β -цепи, погибают. Те же клетки, которые начинают экспрессировать функциональную β -цепь, блокируют процесс дальнейшей рекомбинации, теряют экспрессию CD25 и становятся DN4. В этот период клетки активно пролиферируют, после чего начинается экспрессия одновременно CD4 и CD8. Клетки становятся двойными положительными тимоцитами (англ. "*double-positive*" *thymocytes*, *DP*). Эти клетки составляют основную массу клеток тимуса. Крупные DP клетки активно пролиферируют и уменьшаются в размере. В этот момент начинается рекомбинация α -цепи TCR. Большое количество V и J сегментов α -цепи дает возможность провести несколько раундов последовательной рекомбинации, пока не сформируется функциональная α -цепь. Рекомбинация α -цепи происходит на обеих хромосомах, и формирование функциональной α -цепи на одной из них не прекращает рекомбинацию, что потенциально может привести к формированию двух функциональных α -цепей в одной клетке.

На этой стадии происходит селекция тимоцитов на предмет их возможности узнавать пептиды в комплексе с МНС. APC клетки тимуса экспрессируют на своей поверхности МНС обоих классов, которые презентируют собственные пептиды клетки. В процессе позитивной селекции DP тимоциты взаимодействуют с такими клетками, и если TCR способен связывать комплекс пептид-МНС, он проходит позитивную селекцию, что служит сигналом для прекращения

рекомбинации α -цепи, а также, в зависимости от класса МНС, который связывает TCR, прекращается экспрессия одного из поверхностных маркеров CD4 или CD8. Клетки, TCR которых не способен связать комплекс пептид-МНС, погибают в результате апоптоза.

Вслед за позитивной селекцией происходит негативная селекция, цель которой элиминировать клетки, которые могут активироваться в ответ на распознавание собственного пептида организма. Клетки в медулле тимуса, способны экспрессировать некоторые тканеспецифичные белки разных отделов организма и презентовать их пептиды на своей поверхности. Тимоциты, прошедшие позитивную селекцию, взаимодействуют с этими клетками, а так же с макрофагами и дендритными клетками, презентировавшими собственные пептиды. Если TCR проявляет высокую аффинность в процессе негативной селекции, он будет элиминирован в результате апоптоза, чтобы предотвратить возможную аутоиммунную реакцию. Клетки, прошедшие негативную селекцию, становятся зрелыми CD4⁺ или CD8⁺ Т-лимфоцитами.

Отдельного внимания заслуживает формирование регуляторной Т-клеточной популяции (Treg). Эти клетки также происходят из DP тимоцитов. В отличие от других Т-лимфоцитов, эти клетки селекционируются на предмет высокой аффинности к собственным пептидам клетки, которые способны активировать клетку Treg. Этот процесс называется TCR-агонист управляемая селекция. В процессе своего развития Treg активируются тканеспецифичными пептидами, презентированными эпителиальными клетками медулы тимуса (от англ. medullary thymic epithelial cells, *mTECs*) [12]. Выделяют как минимум две различные популяции предшественников регуляторных Т-клеток, однако до конца неизвестно, как именно им удастся избежать негативной селекции [13].

Еще одна популяция Т-клеток, которая возникает из двойных позитивных тимоцитов, - это инвариантные Т-клетки естественные киллеры (англ. *invariant natural killer cells, iNKT*). Эти клетки экспрессируют рецептор NK1.1. Такие клетки активируются на ранних стадиях инфекции и, в отличие от обычных Т-клеток, их TCR связывается с молекулой CD1 вместо молекул МНС. В процессе

развития этим клеткам необходимо контактировать с клетками, экспрессирующими МНС I и с клетками, экспрессирующими CD1, который связывают и презентуют антигены - липиды, производимые бактериями кишечника. Таким образом, кишечные бактерии определяют развитие iNKT клеток. iNKT клетки несут инвариантную α -цепь, одинаковую для всей популяции.

2.2.5. Активация и последующая дифференциация Т-клеток

Как было сказано выше, активация Т-клеток начинается с распознавания Т-клеточным рецептором антигена, презентированного молекулами МНС. Однако сам TCR не способен передать сигнал активации внутрь клетки для запуска каскада различных процессоров. Для передачи сигнала зрелому TCR необходимо наличие вспомогательных молекул. Во-первых, необходим комплекс CD3, который состоит из 4 цепей (CD3 γ , CD3 δ , и 2 CD3 ϵ), каждая из которых имеет внеклеточный иммуноглобулиновый домен, трансмембранный домен и внутриклеточный хвост. Кроме того, в сигналинге еще принимает участие димер, образованный связанными дисульфидной связью ζ цепями, которые имеют лишь короткий внеклеточный хвост. Их также часто относят к комплексу CD3 (CD3 ζ , так же известен как CD247), хотя эта цепь не гомологична другим [14], в отличие от CD3 γ , CD3 δ , и CD3 ϵ , которые высоко гомологичны друг другу и, как считается, эволюционно произошли в результате дубликации гена предшественника [15].

Через TCR сигнал проводится посредством мотива активации иммунорецептора на основе тирозина (англ. *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif, ITAM*). Такие мотивы входят в состав всех вспомогательных молекул TCR. (Рис. 1) Суммарно в одном комплексе TCR:CD3: ζ есть 10 ITAM. При связывании антигена тирозинкиназа фосфорилирует два тирозина, которые входят в состав каждого ITAM. Фосфорилированные тирозины связывают сигнальный белок ZAP-70 и активируют его. С активации ZAP-70 начинается сигнальный каскад реакций. Кроме того, для активации Т-клетки необходимо взаимодействие комплексов CD8 / CD4 с МНС I / II соответственно. В итоге это

приводит к активации ряда транскрипционных факторов, экспрессии IL-2, реорганизации цитоскелета и усилению активности клеточного метаболизма. Все это приводит к активации Т-лимфоцита.

Однако взаимодействия TCR с презентированным антигеном недостаточно для старта пролиферации и дифференцировки Т-клетки в эффекторную. Есть еще два основных типа сигналов, которые должна получить Т-клетка от антигенпрезентирующей клетки.

Во-первых, клетка должна получить сигнал к пролиферации. Одним из примеров такого сигнала служит взаимодействие комплекса CD28 Т-клетки с комплексом B7-1 (CD80) антигенпрезентирующей клетки. Этот сигнальный путь способствует выработке IL-2. Активация через костимуляторный рецептор ICOS (англ. *inducible co-stimulator*) также способствует пролиферации Т-клеток, выработке IL-4 и IFN- γ , продуцируемых CD4⁺ клетками, и дифференцировке этой популяции клеток в лимфоциты Т-хелперы.

Также стоит отметить роль CTLA-4 (CD152), который конкурирует с CD28 за связывание B7-1 (CD80) и оказывает противоположный эффект, ограничивая пролиферацию Т-клеток по мере их активации.

Еще одним сигналом, который получает Т-клетка, является взаимодействие с цитокинами, которые продуцируются антигенпрезентирующими клетками. Подробнее о влиянии различных цитокинов на судьбу Т-клеток рассказано в следующей главе.

В отличие от CD8⁺, которые имеют лишь одну эффективную форму, цитотоксических Т-лимфоцитов, CD4⁺ Т-клетки могут дифференцироваться в несколько разных типов эффекторных клеток. Направление же дифференциации в частности определяется набором цитокинов, экспрессируемых антигенпрезентирующей клеткой. Кроме того, CD4⁺ Т-клетки могут кросс-регулировать дифференцировку друг друга за счет продукции своих цитокинов. А также эффекторные CD4⁺ клетки способствуют дифференцировке CD8⁺ наивных Т-клеток, активируя экспрессию B7 у дендритной клетки в ответ на свою активацию.

Одним из главных отличий эффекторных Т-клеток от наивных является отсутствие необходимости ко-стимуляции для выполнения своих функций.

2.2.6. Субпопуляции клеток Т-хелперов

CD4⁺ Т-клетки распознают антиген, презентованный МНСII, который экспрессируется на дендритных клетках, фагоцитах и В-клетках. Таким образом CD4⁺ клетки чаще всего распознают пептиды, которые были захвачены фагоцитозом из межклеточного пространства. CD4⁺ клетки - это хелперные клетки. В отличие от CD8⁺ клеток, которые при активации дифференцируются в одну единственную популяцию цитотоксических эффекторных Т-лимфоцитов, после взаимодействия с антигеном CD4⁺, Т-клетки могут дифференцироваться в один из нескольких подклассов. Ниже представлены основные и наиболее изученные подклассы, хотя регулярно выходят работы, свидетельствующие о наличии ранее неизвестных специализированных популяций [16].

Th1 клетки продуцируют интерферон гамма под контролем T-bet. Одной из основных функций этого подкласса является защита от внутриклеточных инфекций, таких как туберкулез [17].

Th2 клетки продуцируют интерлейкины 4, 5 и 13 (IL-4, IL-5, IL-13) под контролем GATA3 и STAT6 [18]. Такие клетки помогают в борьбе с внешеклеточными паразитами, такими как гельминты. Th2 клетки активируют эозинофилы. Кроме того, Th2 и Th1 клетки могут мигрировать в фолликулы лимфоузлов и способствовать выработке антител В-клетками [19].

Th17 клетки продуцируют IL-17A, IL-17F и IL-22. Эти клетки отвечают за защиту от бактериальных и грибковых инфекций, активируют нейтрофилы. Кроме того, Th17 клетки способствуют производству IgG2 и IgG3 антител В-клетками.

Tfh (фолликулярный Т-хелперы) экспрессируют такие маркеры как CXCR5 и PD1. Эти клетки способствуют формированию и поддержанию герминальных центров В-клеток в лимфоузлах.

Treg ингибируют Т-клеточный иммунный ответ, предотвращая аутоиммунную реакцию. Существуют разные механизмы действия. Один из

механизмов основан на экспрессии иммуносупрессирующих цитокинов (TGF- β , IL-10 и IL-35). Другой механизм действия основан на нарушении метаболических путей. Так Treg экспрессируют CD25, тем самым истощая IL-2. Экспрессия CD39 провоцирует деградацию аденозинтрифосфата (АТФ) до аденозинмонофосфата (АМФ), а CD73 способствует превращению АМФ в аденозин, который, связываясь с A2A рецепторами эффекторных Т-клеток, ингибирует их активность и пролиферацию. Treg, также как CD8⁺ клетки, могут синтезировать гранзимы и перфорины, проявляя тем самым цитотоксическую активность. Также Treg могут опосредованно регулировать активность эффекторных клеток, блокируя созревание и антиген-презентирующие свойства дендритных клеток, например, через экспрессию CTLA-4 и LAG-3 [20].

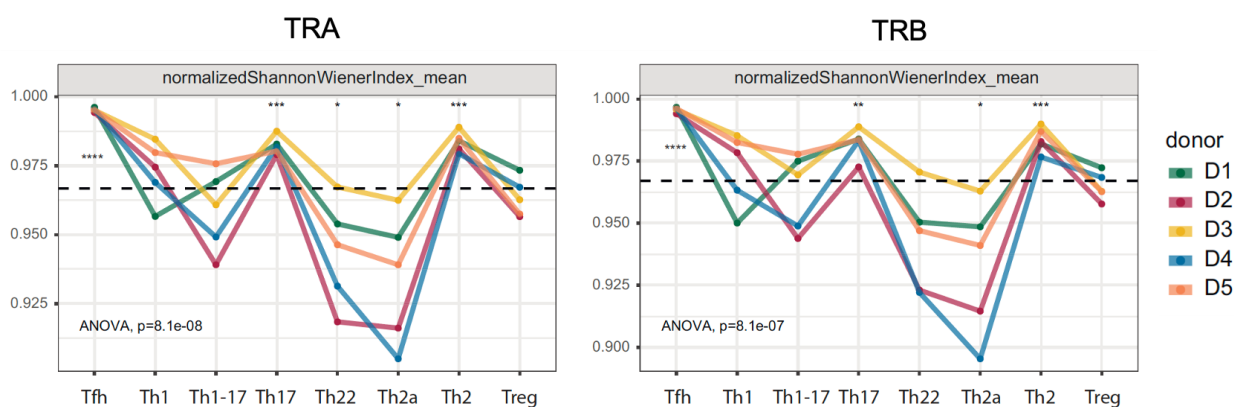


Рисунок 6. Разнообразие популяций эффекторных CD4⁺ Т-клеток / клеток памяти. Каждая линия отражает отдельного донора. Разнообразие рассчитано, как нормализованный индекс Шеннона-Винера. Пунктирная линия отображает среднее значение. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, и ****p<0.0001 (односторонний дисперсионный анализ, ANOVA, с последующим двухвыборочным *t*-критерием Уэлча с коррекцией Бонферрони для каждой группы против среднего значения) [21].

В предыдущей работе нашей группы была показана связь между различными популяциями эффекторных CD4⁺ Т-лимфоцитов и свойствами репертуара Т-клеточных рецепторов (Рис. 6). У Th22 и Th2a популяций наблюдалось низкое разнообразие TCR, указывающее на активную

антиген-специфичную пролиферацию. В то же время Tfh репертуар обладал высоким разнообразием.

Кроме разнообразия, репертуары разных популяций также отличаются своими физико-химическими свойствами CDR3 региона. Известно, что для Treg характерно наличие гидрофобных и сильно-взаимодействующих аминокислот в CDR3 обеих цепей TCR. Популяция Th22 экспрессирует TCR с наиболее длинным CDR3 и наибольшим количеством добавленных нуклеотидов. Популяции Th1 и Th17 по своим физико-химическим свойствам CDR3 больше похожи на Tfh, а Th22, Th2a и Th2 на Treg. (Рис. 7)

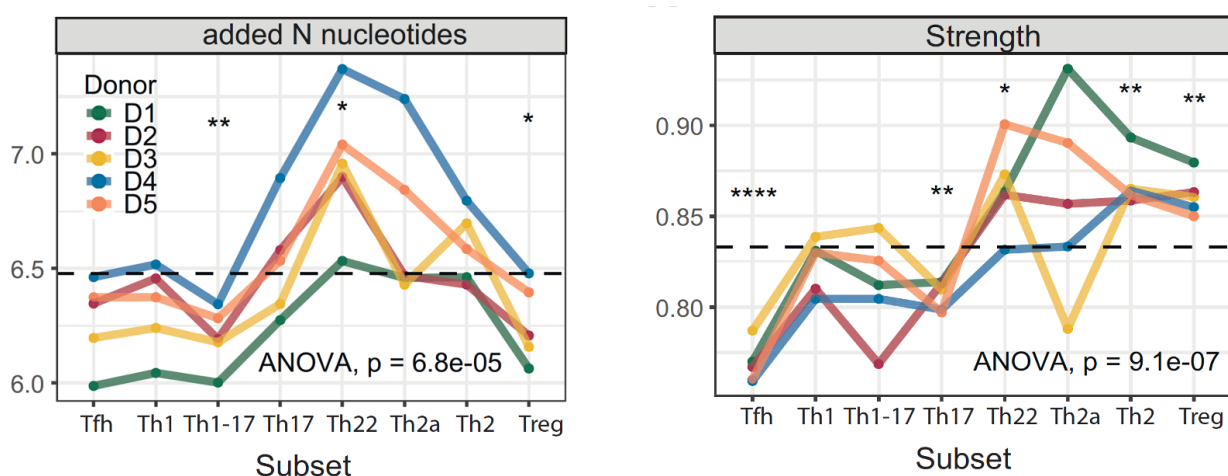


Рисунок 7. Усредненные физико-химические характеристики CDR3 α -цепи TCR для популяций эффекторных CD4⁺ Т-клеток / клеток памяти. Каждая линия отражает отдельного донора. Слева - количество добавленных N-нуклеотидов. Справа - доля сильно взаимодействующих аминокислот отображенная в относительных значениях для 5 центральных аминокислот CDR3. Характеристики нормированы на частоту каждого клона. Пунктирная линия отображает среднее значение. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, и **** $p < 0.0001$ (односторонний дисперсионный анализ, ANOVA, с последующим двухвыборочным t -критерием Уэлча с коррекцией Бонферрони для каждой группы против среднего значения) [21].

Связь между репертуаром и типом CD4⁺ эффекторных клеток предполагает, что еще на момент формирования TCR в тимусе хотя бы частично происходит детерминация фенотипа, который обретет клетка после активации [21].

До конца неизвестно, что является основным фактором при дифференцировке активированных CD4⁺ Т-клеток. По-видимому этот процесс

определяется совокупностью факторов: тип антигенпрезентирующей клетки, цитокиновое окружение и сама структура TCR.

Так же известно, что эффекторные CD4⁺ клетки могут переходить из одного типа в другой при изменении окружения. Например, при заражении мышей лимфоцитарным хориоменингитом, Th2 клетки приобретали фенотип Th1 [22]. Th1 и Th17 в мышцах, зараженных гельминтами, меняли свой фенотип на Th2 [23]. Для Treg была показана относительная стабильность, лишь в критичных системах было показано изменение фенотипа на Th1 [24]–[26]. Иными словами, подклассы CD4⁺ клеток не являются чем-то абсолютно стабильным и строго детерминированным.

2.3. В-клеточный иммунитет

2.3.1. Структура В-клеточного рецептора и антитела

Антитела представляют собой секретируемую форму В-клеточного рецептора и, следовательно, имеют такую же структуру (Рис. 8). Антитела обычно представляют в форме Y. Концы двух ответвлений, V домены, отвечают за связывание антигена, и, так же как антигенсвязывающий участок TCR, эти домены обладают большим разнообразием аминокислотной последовательности. Основание антитела сформировано константным доменом, который взаимодействует с эффекторными молекулами и клетками. По структуре константного домена выделяют 5 классов антител: иммуноглобулин G (IgG), иммуноглобулин M (IgM), иммуноглобулин A (IgA), иммуноглобулин D (IgD) и иммуноглобулин E (IgE).

В состав антитела входят 4 полипептидные цепи: две легких и две тяжелых. Тяжелые цепи соединены друг с другом посредством дисульфидной связи, кроме того, тяжелые и легкие цепи также ковалентно соединены дисульфидной связью. В каждом конкретном иммуноглобулине обе тяжелые и легкие цепи идентичны. Таким образом, антитело имеет два идентичных антигенсвязывающих участка, способных связывать одинаковые эпитопы.

Есть два типа легких цепей: лямбда (λ) и каппа (κ). Каждое антитело состоит либо из двух каппа-цепей, либо из двух лямбда-цепей. Функционально эти цепи не отличаются, однако они неравномерно встречаются в организме. У человека соотношение антител с каппа-цепью к антителам с лямбда примерно 2:1, в то время как у мыши это соотношение 20:1.

В-клеточный рецептор (анг. *B-cell receptor*, *BCR*) имеет идентичную структуру, за исключением гидрофобного хвоста константного региона, при помощи которого рецептор крепится к мембране клетки. У антитела вместо этого гидрофобного участка находится гидрофильная последовательность.

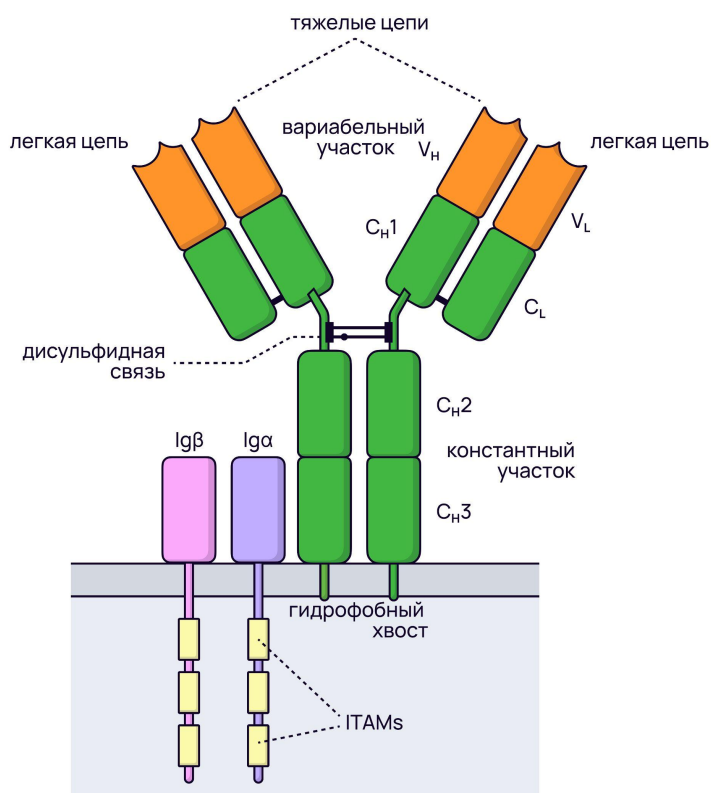


Рисунок 8. Структура В-клеточного рецептора и корцепторов $Ig\alpha$ и $Ig\beta$. Зеленым цветом показаны константные участки тяжелых и легкой цепей, оранжевым - переменные.

Антитело состоит из нескольких характерных третичных белковых структур, которые называются иммуноглобулиновыми доменами. Эти домены гомологичны доменам цепей TCR. Каждая тяжелая цепь состоит из четырех таких доменов (для антитела IgG), а легкая из двух. Функционально эти домены делятся

на переменные и константные. Каждый из двух антигенраспознающих участков складывается из переменных доменов легкой и тяжелой цепи.

2.3.2. Антигенсвязывающий участок BCR и антител

Все антитела отличаются друг от друга последовательностью переменного домена. Эта вариативность неравномерно распределена по аминокислотной последовательности. В каждом V домене тяжелой и легкой цепи есть три участка, отличающиеся большим разнообразием. Также, как у TCR, эти участки называются CDR1, CDR2 и CDR3, и структурно они образуют петли в антигенсвязывающем кармане. Причем наибольшее разнообразие заключено в CDR3. Эти участки разделены зонами с меньшей вариативностью, которые называются фреймворк-регионами - FR1, FR2, FR3, FR4.

В отличие от TCR, антитела связывают свободные антигены и не нуждаются в представлении антигена в контексте MHC молекул.

2.3.3. Локус BCR и формирование B-клеточного репертуара

Локусы генов, кодирующих цепи BCR, устроены похожим образом, как локусы TCR. (Таб. 2) Зрелая легкая цепь кодируется тремя сегментами: V, J и C. Зрелая тяжелая цепь кодируется 4 сегментами: V, J, D и C. В локусах тяжелой и легкой цепей есть несколько вариантов каждого сегмента, которые при созревании соединяются в последовательность V(D)JС в процессе V(D)J-рекомбинации, которая проходит таким же образом, как и у TCR.

В локусе есть несколько разных С-генов, которые кодируют различные изоформы иммуноглобулинов. Выбор этих сегментов происходит в результате геномной перестройки уже после активации В-клетки. Изначально наивная В-клетка может экспрессировать два изоформы IgM и IgG. Выбор С-гена между этими двумя изоформами происходит на уровне альтернативного сплайсинга мРНК, а не в результате рекомбинации ДНК.

Таблица 2. Количество генных сегментов в локусах генов BCR человека и мыши [6]

Сегмент	Легкие цепи		Тяжелая цепь
	κ	λ	
V	108/176	79/12	164/216
D	0	0	37/17
J	5/5	7/7	9/4
C	1/6	9/7	11/9

Также, как в локусах TCR, направление рекомбинации определяется последовательностями RSS, которые фланкируют генные сегменты. В отличие от TCR, типы RSS с разной длиной спейсера по-другому распределены между сегментами, однако правило 23\12 также сохраняется (Рис. 9).

За исключением вышеперечисленных особенностей, процесс V(D)J-рекомбинации цепей BCR полностью повторяет таковой у TCR.

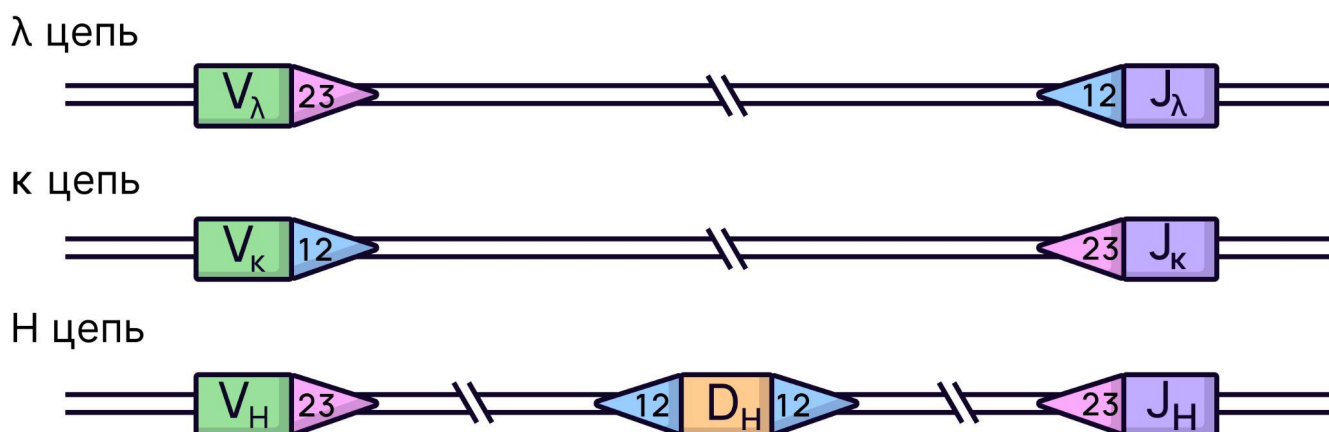


Рисунок 9. Распределение RSS со спейсерами разной длины в генах тяжелой и легких цепей иммуноглобулинов.

2.3.4. Созревание и селекция В-клеток

В-клетки формируются из тех же гемопоэтических стволовых клеток костного мозга, что и Т-клетки. В отличие от Т-клеток, основные стадии развития В-клетки происходят в костном мозге. На первой стадии происходит рекомбинация генов тяжелой цепи. Вначале рекомбинируют D и J сегменты одновременно на обоих аллелях. На этой стадии клетки называются про-В-клетки. У человека D сегменты устроены таким образом, что независимо от рамки считывания, там не образуются стоп-кодоны, и, как следствие, нет специальной проверки на функциональную пригодность результата DJ рекомбинации. Затем на поздней про-В стадии развития начинается рекомбинация V сегмента с участком DJ. Эта рекомбинация происходит вначале на одной из хромосом. Если в результате первой рекомбинации сформировалась нефункциональная последовательность, включающая стоп-кодоны, рекомбинация запускается на второй хромосоме. В случае успеха, клетка начинает экспрессировать зрелую тяжелую цепь с μ С-сегментом. В противном случае клетка погибает. Около половины клеток не проходят эту стадию развития. Если функциональная тяжелая цепь формируется в первый раунд рекомбинации на первой хромосоме, рекомбинация на второй хромосоме тормозится, и другая аллель становится неактивной. Поскольку к этому моменту локус легкой цепи еще сам не прошел рекомбинацию, при проверке тяжелой цепи на функциональность, она формирует рецептор с суррогатной инвариантной легкой цепью, которая получается в результате димеризации двух других белков - $\lambda 5$ и VpreB. Структурно комплекс этих белков напоминает легкую цепь. Формирование такого рецептора сигнализирует клетке переход на следующую стадию развития. Также на этой стадии начинается экспрессия белков I α and I β , которые являются функциональными аналогами CD3 комплекса у Т-клеток и имеют мотив ITAM. Кроме того, начинается экспрессия корецептора CD19, одного из основных В-клеточных маркеров.

Прошедшие эту стадию клетки называются пре-В клетками. Фермент TdT, который, также как в случае Т-клеток, участвует в рекомбинации и добавляет

случайные N-нуклеотиды в месте сочленения сегментов, более активен на про-В-стадии, а затем его экспрессия снижается, что объясняет значительно меньшее количество добавленных букв в легкой цепи в сравнении с тяжелой.

Изначально крупные пре-В клетки активно делятся и уменьшаются в размере. Затем начинается процесс VJ рекомбинации легкой цепи. Вначале рекомбинация также происходит только на одной из хромосом. Причем, в случае формирования нефункциональной последовательности легкой цепи BCR, рекомбинация последовательно проходит несколько раз на одной и той же хромосоме, прежде чем начнется рекомбинация другой аллели. За счет такого большого количества попыток рекомбинации, большинство пре-В клеток в итоге начинают экспрессировать полноценные молекулы IgM в состав которых уже входят и легкие, и тяжелые цепи. Такие клетки называются незрелыми В-лимфоцитами. Прежде чем выйти из костного мозга, эти клетки проходят проверку на аутореактивность. Аутореактивные В-клетки либо уничтожаются при помощи апоптоза, либо легкая цепь подвергается еще одному раунду рекомбинации, и проверка проходит заново.

Если BCR В-клеток не взаимодействует с собственными антигенами организма, то они выходят из костного мозга в венозный кровоток и направляются в селезенку, где происходит их дальнейшее созревание.

Попав в периферийные лимфоидные органы, все еще незрелые В-лимфоциты проходят вторую стадию проверки на аутореактивность к ткани-специфичным антигенам. Те лимфоциты, которые пройдут периферийную селекцию на отсутствие аутореактивности, попадают в фолликулы селезенки для окончательного созревания. Там В-клетки начинают экспрессировать еще один характерный для них корецептор - маркер CD21 и становятся зрелыми В-лимфоцитами.

2.3.5. Активация и последующая дифференциация В-клеток

Активация В-клеток происходит в лимфоузлах. Последовательность событий в процессе первого этапа активации В-лимфоцитов антигеном схожа с

Т-клетками. В ответ на связывание антигена происходит фосфорилирование тирозинов в ИТАМ белков $Ig\alpha$ and $Ig\beta$ (Рис. 8). Это приводит к связыванию и активации сигнального белка Syk (аналог ZAP-70), который запускает каскад сигнальных реакций.

Связывание антигена В-клеткой приводит к активации ряда транскрипционных факторов, перестройкам цитоскелета и изменениям в клеточном метаболизме.

Однако, как и Т-клеткам, одного лишь узнавания антигена В-клеточным рецептором недостаточно для активации наивного В-лимфоцита.

В большинстве случаев для активации В-клеток необходимо взаимодействие с Tfh Т-лимфоцитами. Разпознав антиген, В-клетка способна перенести его во внутриклеточное пространство, где он процессируется и в комплексе с МНС II возвращается на поверхность. В таком виде этот антиген узнает Tfh клетка, образованная в результате активации наивной Т-клетки в ответ на тот же антиген. На поверхности Tfh находятся молекулы CD40L(CD154), которые являются лигандом поверхностного белка В-клетки - CD40. Этот сигнал запускает каскад реакций, в итоге приводящий к повышению жизнеспособности В-клетки, ингибируя механизмы апоптоза. Помимо этого, Tfh экспрессирует различные цитокины, которые, во-первых, приводят к активной пролиферации В-клетки, а, во-вторых, способны регулировать тип антител, которые будут секретировать В-клетки данного клона.

В ответ на взаимодействие с Tfh, В-клетка начинает экспрессировать ICOSL (лиганд для ICOS), что приводит уже к сигналингу в фолликулярной Т-клетке, который способствует ее дифференцировке.

Еще одним сигналом, стимулирующим активацию В-клеток, является взаимодействие CD19 на поверхности В-клетки с CD21, который узнает белки системы комплемента C3d и C3dg, которыми помечен антиген.

После активации В-клетка несколько дней активно делится, и затем часть В-клеток дифференцируется в плазмобласты, основной задачей которых будет продуцирование антител. Другая часть клеток дифференцируется в

плазматические клетки. Основное отличие между ними заключается в том, что плазмобласты еще содержат на своей поверхности В-клеточный рецептор, в то время как плазматические клетки практически нет.

Отдельная часть В-клеток не дифференцируется в эффекторную форму, а, вместе с ассоциированными Tfh, активно делится, образуя герминативный центр. В герминативном центре В-клетки претерпевают уникальные изменения, которые приводят к повышению аффинности BCR к антигену. Кроме того, В-клетка модифицируется для производства разных классов антител, выполняющих разные эффекторные функции.

Первый процесс называется соматической гипермутацией. Его суть состоит в том, что, при помощи цитидин-диаминазы AID и белков систем репарации ДНК, в V ген цепей BCR вносятся мутации. Большинство таких мутаций приводит к потере способности клетки распознавать антиген или вовсе формировать функциональный белок, и такие лимфоциты подвергаются апоптозу. Однако более редкие мутации могут усилить аффинность рецептора к антигену. Такие клетки будут подвергаться селективному отбору при пролиферации. Большинство мутаций, которые будут закрепляться, находятся в CDR участках V гена. Позитивная селекция в процессе гипермутации основана на способности В-клетки распознавать антиген, презентированный фолликулярными дендритными клетками, а также на получении сигнала от Tfh, способствующего выживанию В-лимфоцита.

Еще один важный процесс, происходящий с В-клетками в герминативном центре, - это переключение изотипов. Как уже было отмечено ранее, у BCR есть несколько разных С генов, определяющих их изотип (Рис. 10).

Наивные клетки экспрессируют рецепторы двух изотипов: IgM и IgD. Выбор из этих двух классов происходит за счет альтернативного сплайсинга. При этом, в процессе иммунного ответа, первыми всегда образуются IgM антитела. На более поздних этапах иммунного ответа В-клетка с такой же специфичностью может начать продуцировать антитела других изотипов (IgG, IgA или IgE). В отличие от перехода между IgM и IgD, экспрессия других изотипов основана на

негомологичной рекомбинации ДНК, между участками которой расположены перед каждым С геном В-клеточного рецептора. Исключения составляют гены C_μ и C_δ , которые имеют один участок рекомбинации на двоих. Эти участки называются регионами переключения изотипов. Когда клетка переходит от ко-экспрессии IgM и IgD к другому классу, происходит рекомбинация между регионом переключения, находящимся перед генами C_μ и C_δ и регионом соответствующего С гена.

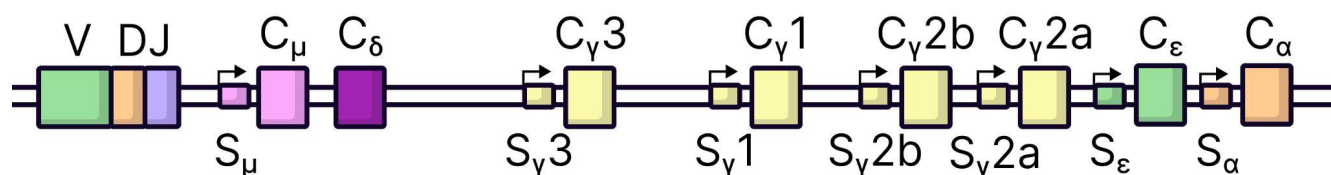


Рисунок 10. Организация С сегментов локуса генов В-клеточного рецептора. Сегменты (С) окрашены в цвета соответствующего изотипа или группы изотипов. Слева от сегментов отображены участки рекомбинации (S), транскрипция которых регулирует смену изотипа.

Механизм переключения изотипов основан на транскрипции участков рекомбинации. Последовательности этих участков разные, но всегда содержат G повторы. Когда РНК-полимераза проходит такой участок, новосинтезированная РНК образует G-квадруплекс, который тормозит РНК-полимеразу. Эта структура привлекает белок AID, который вносит двухцепочечные разрывы в молекулу ДНК. Затем клеточные механизмы негомологичной рекомбинации соединяют два участка рекомбинации друг с другом. Таким образом, переключение изотипа определяется транскрипцией конкретного участка рекомбинации, находящегося перед соответствующим С геном. Как уже было сказано, на экспрессию конкретного изотипа оказывают влияние молекулы цитокинов. Цитокины запускают каскад реакций, который активирует соответствующий транскрипционный фактор, инициирующий транскрипцию в конкретном участке рекомбинации.

После того, как процесс гипермутации завершился, и произошло переключение изотипа, одни В-клетки становятся плазматическими, их

пролиферация прекращается, и они начинают в большом количестве продуцировать антитела. Другие клетки становятся В-клетками памяти.

2.3.6. Классы антител

Класс антитела определяет его функциональность и локализацию.

IgM формируют пентамеры и в основном обнаруживаются в крови. Эти антитела отвечают за активацию системы комплемента.

IgG обладают более высокой аффинностью и находятся не только в крови, но и в межклеточной жидкости. В их функции входит нейтрализация токсинов и вирусов, а также инициация фагоцитоза бактерий.

IgA выполняют схожие с IgG функции, но локализуются в основном в просвете кишечника.

IgE антитела связываются с поверхностью тучных клеток и отвечают за местные защитные механизмы.

2.3.7. В1 клетки

В самом начале В-клеточного развития возникают две отдельные ветви от разных предшественников. Считается, что В1-клетки развиваются из зародышевых клеток печени плода. На это в частности указывает отсутствие добавленных N-нуклеотидов в генах BCR. В других типах В-клеток эти нуклеотиды добавляются ферментом TdT во время рекомбинации в постнатальный период. Основным маркером этой популяции является CD43 [27]. В1-клетки обычно обнаруживаются в полости брюшины. В1 клетки в свою очередь делятся на две популяции: В1а и В1b. В1а-клетки несут на своей поверхности Т-клеточный маркер CD5 [28] и отвечают за продукцию большей части IgA и IgM антител в отсутствии антигенов [29]. Кроме того В1а-клетки способны к антиген-зависимой активации без участия Т-клеток [30]. К такому же типу активации способны и В1b клетки, однако, они в основном производят IgM и могут формировать клеточную память к Т-независимым антигенам.

В1-клетки, будучи антигенпрезентирующими, способны активировать CD4+ Т клетки. В брюшной полости такая активация приводит к продуцированию Т-клетками IL-10, IL-4 и интерферона гамма. В1-клетки также обнаруживаются в селезенке, и там они способствуют Th17 дифференциации Т-клеток.

2.3.8. В2-клетки

К В2-клеткам относится большинство зрелых В-клеток организма, и обычно именно этот тип подразумевается, когда речь идет о В-клетках. Процесс созревания этих клеток был описан выше. В отличие от В1-клеток, В2-клеткам для созревания нужна стимуляция через рецептор к BAFF, который продуцируется макрофагами, моноцитами, дендритными и Т-клетками [31].

В2-клетки делятся на две популяции: фолликулярные В-клетки (FO) и В-лимфоциты маргинальной зоны (MZ). MZ В-клетки высоко экспрессируют CD21 и слабо экспрессируют CD23 [32]. При активации MZ-клетки дифференцируются в плазматические клетки, которые в большом количестве продуцируют IgM. Эти клетки обладают фагоцитарной и антигенпрезентирующей активностью [33]. CD4+ Т-клетки, активированные MZ В-клетками, дифференцируются в Th1 [34].

FO-клетки после активации дают начало долгоживущим плазматическим клеткам, продуцирующим большое количество антител. Однако, большинство FO-клеток вначале взаимодействуют с Tfh и формируют герминативный центр, что было описано выше. Там они проходят через процесс гипер-мутирования и смены изотипа. После чего, при активации, они будут продуцировать антитела различных классов: IgM, IgG, IgA, IgE [35].

2.3.9. Регуляторные В-клетки (Breg).

До конца неизвестно, откуда появляются Breg. Однако считается, что у этого типа нет отдельного прекурсора, а скорее Breg развиваются из разных В-клеточных популяций и, как было показано, несут маркеры тех групп, от которых они произошли [36]. Разные группы Breg выполняют разные функции.

У людей и мышей был найден сабсет B10, продуцирующий IL-10. У мышей эта популяция определяется наличием CD1d, а у людей CD24. B10 регуляторные клетки ингибируют Th1 и Th17 дифференциацию [37], [38].

У мышей была обнаружена TIM-1+ популяция, способствующая Th2 дифференциации и образованию Treg [39].

B1a и MZ B-клетки также могут подавлять активацию CD4+ и CD8+ T-лимфоцитов, поэтому иногда их относят к Breg [40].

У мышей и у людей была обнаружена популяция Breg, экспрессирующих PD-L1. Было показано, что у мышей эта популяция приводит к дифференциации Treg, а у людей к подавлению экспрессии проинфламаторных цитокинов и ингибированию активации CD8+ T-клеток [41].

В работе Kaku et. al [42] была описана популяция B-клеток, экспрессирующих CD73, являющийся маркером Treg, которая ингибирует эффекторные T-лимфоциты.

2.4. Иммунологическая память

Как было сказано выше, в процессе первичного иммунного ответа (при первой встрече с антигеном) некоторые T- и B- клетки дифференцируются в клетки памяти. Способность организма быстрее и эффективнее отвечать на повторное попадание антигена называется вторичным иммунным ответом. В основе вторичного иммунного ответа лежат T- и B-клетки памяти и антитела, сформировавшиеся в результате первичного ответа.

2.4.1. B-клеточная память

B-клетки памяти могут образоваться в герминативном центре, где они подвергаются гипермутации и смене изотипа, или из циркулирующих плазматических клеток. Для B-клеток памяти характерна локализация в селезенке и лимфоузлах. От наивных и плазматических клеток клетки памяти отличаются набором маркеров. Для человека одним из основных маркеров B-клеток памяти является поверхностный рецептор CD27. В отличие от наивных клеток, не

претерпевших смену изотипа, большинство клеток памяти экспрессируют в основном IgG, а так же IgA и IgE. Поэтому, при вторичном иммунном ответе, такие антитела в крови появляются намного быстрее, ведь для этого не нужно ждать, пока пройдет переключение изотипа с наивного IgM. Кроме того, В-клетки памяти, по сравнению с наивными, имеют более высокую экспрессию МНС II и В7.1, что усиливает сигнал от Tfh клеток и ускоряет продукцию антител.

Когда антиген повторно попадает в организм, первый уровень защиты основан на оставшихся антителах. При узнавании антигена, они метят его для уничтожения системой комплемента или фагоцитозом. Если антител оказалось недостаточно для полной нейтрализации патогена, начинается вторичный иммунный ответ, для которого необходимо узнавание антигена В-клеточным рецептором. Поскольку В-клетки памяти обладают повышенной аффинностью, их ответ является основным при вторичном заражении. Кроме того В-клетки памяти могут повторно заходить в герминативные центры, подвергаться гипермутации, тем самым еще больше усиливая свою аффинность, после чего они дифференцируются в плазматические клетки и начинают производить антитела.

2.4.2. Т-клеточная память

До конца непонятно происхождение Т-клеток памяти. Одна из теорий предполагает, что после того, как давление антигена слабеет, некоторые эффекторные клетки либо случайно, либо по причине их более высокой специфичности, становятся клетками памяти. При повторном заражении такие клетки заново активируются.

Согласно другой теории, все эффекторные Т-клетки погибают после исчезновения антигена в результате апоптоза. Т-клетки памяти же образуются из наивных клеток, которые были активированы, но, по причине низкой аффинности в сравнении с другими клетками, не стали полноценными эффекторными клетками.

Т-клетки памяти перестают экспрессировать CD69. Так же среди основных маркеров можно выделить экспрессию CD127 (альфа-субъединица рецептора к

IL-7). Т-клетки памяти делятся чаще наивных. Для их выживания им необходимы сигналы интерлейкинов IL-7 и IL-15. Для реактивации им, как и наивным клеткам необходим контакт с антигеном, презентированным МНС. Однако они намного сильнее реагируют на это взаимодействие и быстрее начинают производить различные цитокины.

После реактивации CD4⁺ клетки памяти начинают экспрессировать CD62L и CD44, что приводит к их локализации в периферических тканях.

CD4 и CD8 клетки памяти делят на несколько функциональных классов с различным паттерном экспрессии маркеров.

Т-клетки центральной памяти (англ. *central memory T-cell, T_{cm}*) экспрессируют рецептор CCR7, чаще всего находятся в лимфоузлах и периферических лимфоидных органах. Эти клетки довольно быстро начинают экспрессию CD40 в ответ на реактивацию, однако они медленнее дифференцируются в эффекторные клетки.

Т-клетки эффекторной памяти (англ. *effector memory T-cell, T_{em}*) экспрессируют интегрины $\beta 1$ и $\beta 2$ и способны быстро проникать в очаг воспаления. Такие клетки в ответ на реактивацию довольно быстро начинают экспрессию интерферона гамма, IL-4 и IL-5 и дифференцируются в эффекторные. T_{em} клетки циркулируют между периферийными не лимфоидными органами, лимфоузлами и селезенкой.

Тканеспецифичные Т-клетки памяти (англ. *resident memory T-cell, T_{rm}*) локализованы в различных эпителиальных тканях. Эти клетки экспрессируют CXCR3 и CCR9.

Хотя паттерн экспрессии маркеров у разных классов различается, многие маркеры одного класса экспрессируются у части клеток другого. Например, при реактивации T_{cm} клетки могут дифференцироваться в T_{em}.

2.5. Возрастные изменения адаптивного иммунитета

С возрастом способность адаптивного иммунитета противостоять попавшим в организм патогенам снижается. Это происходит в результате комплекса изменений как в структуре тканей, дающих начало лимфоцитам, так и в изменении соотношения функциональных типов Т- и В-клеток.

2.5.1. Т-клетки

Одним из самых наглядных явлений в процессе старения иммунной системы является инволюция тимуса, в котором, как было сказано выше, происходит созревание новых Т-лимфоцитов. У людей инволюция тимуса начинается с самого детства, и уже к 8 годам тимус значительно деградирован, и этот процесс продолжается еще несколько десятилетий в более умеренном темпе. Однако у взрослых людей значительная часть новых Т-лимфоцитов появляется в результате периферической пролиферации. Считается, что с момента рождения и с течением жизни вклад тимуса в производство новых Т-клеток снижается с порядка 16% до менее одного процента. Такое падение компенсируется небольшим усилением периферической пролиферации с возрастом.

У молодых мышей количество лимфоцитов, производимых тимусом, в 2-4 раза выше, чем количество Т-клеток, образующихся в результате периферической пролиферации. В частности молекулярные дефекты, возникающие в стареющих гемопоэтических клетках, оказывают сильное влияние на периферические Т-лимфоциты. У мышей тимус инволюционирует более градуально, и, даже у старых мышей, он проявляет активность.

Однако периферическая пролиферация у людей больше поддерживает пул наивных CD4⁺ клеток, в то время как относительная доля и абсолютное число CD8⁺ Т-лимфоцитов значительно снижаются с возрастом, параллельно с накоплением CD8⁺ Т-клеток памяти и увеличением их клональности [43]. До конца неизвестно, почему титр наивных CD8⁺ клеток снижается значительно быстрее. По одной из версий на большую способность к выживанию наивных CD4⁺ клеток, влияет IL-2, так как они увеличивают экспрессию рецептора к этому

цитокину (CD25). CD8⁺ клетки активируются проще, чем CD4⁺, вследствие чего большая доля их дифференцируется в эффекторные клетки. Кроме того, на мышцах было показано существование и накопление с возрастом Т-клеток виртуальной памяти (англ. *virtual memory T-cell, Tvm*). Эти клетки были активированы сигналами цитокинов, без участия антигена, однако паттерн экспрессии маркеров в таких клетках похож на классические антиген-активированные клетки. Было показано, что CD8⁺ наивные клетки чаще дифференцируются в Tvm, что также может вносить вклад в более значительное сокращения их популяции по сравнению с CD4⁺.

Периферическая пролиферация наивных Т-лимфоцитов происходит во вторичных лимфоидных органах. Ключевую роль в этом процессе играет IL-7, секретируемый фибробластическими ретикулярными клетками, а так же небольшой уровень стимуляции TCR собственными пептидами организма антигенпрезентирующими клетками. Таким образом, возрастные изменения структуры вторичных лимфоидных органов могут оказывать негативное влияние на пролиферацию наивных Т-клеток. Также было показано, что у CD8⁺ (в отличие от CD4⁺) клеток локус, кодирующий рецептор к IL-7, с возрастом накапливает метки неактивного хроматина. Кроме того, падает экспрессия транскрипционного фактора FOXO1, отвечающего за экспрессию этого рецептора.

В популяциях наивных клеток с возрастом наблюдается снижение разнообразия репертуара Т-клеток. Снижение репертуара происходит параллельно с изменением его свойств. Подробный анализ бета-цепей TCR показал, что с возрастом сокращается средняя длина CDR3 и NDN, а так же количество добавленных букв N. Эти изменения касаются как CD4, так и CD8 наивных клеток [5].

Помимо гомеостаза наивных Т-клеток, также должны поддерживаться популяции клеток памяти. Было показано, что иммунологическая клеточная память может существовать десятилетиями, почти всю жизнь. При этом продолжительность жизни индивидуальных клеток памяти оценивается сроками в 6-12 месяцев. Это означает, что гомеостаз этих популяций также поддерживается

за счет периферической пролиферации. Кроме того, в результате реактивации клеток памяти повторным попаданием в организм антигена, происходят кратковременные точечные экспансии специфичных клеток, что может вытеснять другие малочисленные клетки памяти. Однако в эксперименте с мышами, содержащимися в стерильных условиях, было показано, что даже в отсутствие антигена есть популяции CD4⁺ эффекторных клеток памяти, размножающиеся с разной скоростью. Удивительным образом, в этом же эксперименте было показано, что еженедельно у молодых мышей порядка 10% наивных клеток “переходили” в популяцию клеток памяти [44].

В целом, как для наивных, так и для клеток памяти, с возрастом характерны изменения, делающие их похожими на дифференцированные клетки, что приводит к потере пластичности. Это явление больше характерно для CD8⁺ клеток, но так же затрагивает и CD4⁺. Этому процессу сопутствует тот факт, что эпигенетические маркеры и экспрессия генов, как у наивных Т-лимфоцитов, так и у клеток памяти, с возрастом начинают больше напоминать состояние активированных и дифференцированных клеток. Эта возрастная дифференциация происходит не равномерно относительно типов эффекторных клеток и меняет их соотношение. Так, с возрастом в CD4⁺ наивных клетках повышается экспрессия miR-21, что приводит к дифференциации в инфламаторные эффекторные Т-клетки вместо Tfh и клеток памяти [45].

Еще одним примером может служить увеличение числа наивных клеток, идущих по пути дифференциации Th9 с возрастом. Это происходит вследствие усиления ответной реакции на TGFβ из-за увеличения уровня экспрессии рецептора TGFβR3 и как следствие транскрипционного фактора PU.1. Также с возрастом Т-клетки в ответ на активацию TCR повышают экспрессию некоторых транскрипционных факторов, участвующих в Th9 дифференциации [46].

С возрастом у людей накапливается популяция CD45RA (обычно маркер наивных клеток) эффекторных CD8⁺ Т-клеток памяти (Temra, англ. effector memory cells re-expressing CD45RA). Эта популяция обладает очень высокой олигоклональностью и потенциально вносит значительный вклад в снижение

разнообразия с возрастом. Эти клетки, в отличие от других популяций, наиболее ярко обладают признаками клеточного старения: пониженная пролиферация, дефектные митохондрии, укороченные теломеры, повышенная секреция TNF и интерферона γ , цитотоксическая активность и активный p38 MAPK сигналинг. Одним из маркеров таких клеток является CD57. Возникновение этих клеток связывают с хроническими вирусными инфекциями, такими как CMV и вирус Эпштейна-Барра. Однако было показано, что у здоровых людей Temra клетки обнаруживаются в незначительном количестве [47].

В недавнем исследовании методом транскриптома единичных клеток (англ. *single-cell RNAseq*, *scRNA-seq*) была определена ассоциированная с возрастом популяция CD8⁺ клеток, экспрессирующих контрольную точку PD-1 и транскрипционный фактор TOX [48]. Эти клетки отсутствуют у молодых мышей и составляют больше половины CD8⁺ клеток в селезенке, печени, легких и жировой ткани старых мышей. У этих клеток так же высоко экспрессируется иммунорецептор TIGIT. При активации они продуцируют набор проинфламаторных молекул, таких как гранзим К (GZMK) и CCL5. В той же работе показали, что у людей также накапливаются с возрастом популяции эффекторных CD8 клеток, экспрессирующих GZMK, но, в отличие от мышей, не экспрессирующих PD-1. Важно отметить, что у людей эта популяция экспрессирует CD28, не экспрессирует CD57, и, следовательно, эти клетки отличаются от Temra. Для CD4⁺ клеток памяти у мышей также было показано накопление с возрастом популяции клеток экспрессирующих PD1 [49].

Известным наблюдением также является рост численности Treg клеток с возрастом в селезенке и лимфоузлах [50]–[52]. Было показано, что рост касается активированных Treg, для которых характерны высокие уровни экспрессии FoxP3, CD81, CD74 и маркеров активации (как Tnfrsf9) [53].

Так же было показано, что вместе с активированными Treg растет популяция цитотоксических CD4⁺ клеток, которые высоко экспрессируют Eomes и Gzmk. Эти клетки при стимуляции продуцируют не только IFN γ и TNF, но также и цитотоксичный GZMB с перфорином [54]. Цитотоксичные CD4⁺ клетки

обнаруживались в большом количестве у взрослых пациентов (32-91 год), больных COVID-19 в легкой форме, по сравнению с пациентами, у которых болезнь протекала тяжело. Возможно эта популяция клеток играет важную роль во время вирусной инфекции [47].

В работе нашей группы было показано, что с возрастом у мышей разнообразие TCR эффекторных клеток и клеток памяти падает по меньшей мере в два раза [55]. В другой работе мы показали снижение разнообразия TCR у людей. Разнообразие падало примерно в два раза с возрастом в популяциях CD4+ и CD8+ клеток памяти [56].

Однако основное падение разнообразия CD4+ клеток памяти происходит за счет сильной экспансии Treg и цитотоксических CD4 клеток, другие компартменты сохраняют свое разнообразие у людей даже в глубокой старости [57].

До сих пор неизвестно, насколько сильно снижение репертуара влияет на функциональность Т-клеточного иммунитета. Хотя косвенно ранее мы показали, что продолжительность жизни связана с Т-клеточным разнообразием [56].

Отдельного внимания заслуживает динамика публичных клонотипов. Публичными считаются клоны, последовательности CDR3 которых полностью или почти полностью повторяются у разных особей. Есть несколько теорий происхождения таких клонов. Поскольку эти клоны можно обнаружить и в наивных репертуарах, их природа, по крайней мере отчасти, не связана с генерацией иммунного ответа на распространенные в популяции вирусы. По одной из версий, наличие публичных клонов связано с их возникновением в ранний период развития плода. В подтверждение этой теории, для публичных клонов было показано наличие меньшего количества или почти полное отсутствие добавленных N-нуклеотидов. Так как TdT еще не экспрессируется на ранних стадиях развития, вероятность формирования в этот период одинаковых клонов у разных особей выше [58], [59]. Однако это не объясняет существование публичных клонов с довольно большим количеством добавленных букв [60]. Согласно еще одной теории, публичные клоны появляются в результате свойств

тех или иных последовательностей во время рекомбинации. Эта теория основана на разной частоте “использования” V и J сегментов, кроме того было показано, что для конкретных сегментов характерно разное количество удаленных во время рекомбинации нуклеотидов [61], [62]. Эти наблюдения, однако, не объясняют того факта, что публичные клоны часто кодируются разными нуклеотидными последовательностями, иногда даже в пределах одного организма [63].

Одной лидирующей в настоящее время теорией является конвергентная рекомбинация. Рекомбинация происходит таким образом, что возникновение аминокислотных последовательностей одних клонов “более выгодно”, чем других. Это предполагает наличие вероятности сборки конкретных клонов. Эта вероятность включает в себя как вероятность возникновения одинаковых нуклеотидных последовательностей, о чем было сказано выше, так и вероятность возникновения разных нуклеотидных последовательностей, кодирующих одну и ту же аминокислотную последовательность клона. Кроме того, на более высоком уровне также существует наличие определенных аминокислотных мотивов. Иными словами, для того, чтобы клон был публичным, не нужно полное совпадение аминокислотной последовательности, а достаточно наличие определенного мотива, допускающего вариативность [64].

В одной из работ наша группа исследовала динамику публичных клонотипов с возрастом у людей. Мы показали, что для публичных клонов характерно малое количество добавленных букв, и что некоторые V сегменты встречаются гораздо чаще, чем в среднем для всего репертуара. Количество публичных клонов в репертуаре было максимальным в образцах пуповинной крови и снижалось с возрастом [65].

2.5.2. В-клетки

Известно, что с возрастом как у мышей, так и у людей уменьшается образование предшественников В-клеток в костном мозге [66]. Несмотря на это, для периферических В-клеток был показан другой паттерн поведения. У мышей количество В-клеток в селезенке не менялось с возрастом, главным образом за

счет экспансии аутореактивных и ассоциированных со старением В-клеточных популяций [67]. Однако популяции фолликулярных В-лимфоцитов и MZ В-лимфоцитов медленно падают в численности с возрастом [68], [69].

Для людей также было показано существование ассоциированных со старением популяций В-клеток, однако, общая численность В-лимфоцитов с возрастом в отличие от мышей снижается [70].

В другой работе, где более детально исследовали динамику различных популяций, было показано, что число наивных В-клеток с возрастом не уменьшалось, но уменьшалось количество клеток памяти. В этом же исследовании показано, что с возрастом снижается активность рекомбинации, приводящей к смене изотипа. Вероятно это происходит в результате снижения экспрессии AID и понижения стабильности mRNA - транскрипционного фактора E47 [70]. Это частично объясняет тот факт, что молодые мыши больше экспрессируют IgG, а старые IgM [71]. Одна из причин этого - низкая экспрессия дендритными и Т-клетками маркеров активации В-клеток (напр. CD40L), что приводит к снижению количества В-лимфоцитов в герминативном центре и нарушениям процессов смены изотипа. Кроме того, с возрастом растет количество Treg, подавляющих В-клеточную активность [72], [73]. Также было показано, что с возрастом снижается аффинность антител [74].

В селезенке и костном мозге с возрастом накапливается ассоциированная со старением популяция В-клеток. В селезенке мышей в возрасте 24-30 месяцев на эту популяцию приходится половина всех В-клеток [75]. По своим маркерам она отличается от наивных и клеток памяти. В двух работах по-разному описали маркеры этой популяции. В одной работе она охарактеризована как CD43-CD21/CD35- CD23-, тогда как в другом исследовании группа этих клеток была описана как CD11b+CD11c+. От В1 клеток они отличаются отсутствием экспрессии CD43 и CD5, а от MZ и FO В-лимфоцитов независимостью от BAFF [76],[77]. Однако, по всей видимости, эти клетки образуются в результате независимой от Т-клеток активации В-клеток герминативного центра [78]. Эти клетки экспрессируют транскрипционные факторы Tbx21 и Zbtb32,

аполипротеин Apoe и другие маркеры, в частности Cxcr3 [48]. Tbx21, он же T-bet, стимулирует смену изотипа на IG2A у мышей [79].

Для людей было показано, что В-клетки, ассоциированные со старением, имеют повышенный уровень IgG1 [80]. Анализ репертуара В-клеточных рецепторов этой популяции показал, что это антиген-активированные клетки с высокой степенью гипермутаций [78]. При активации эти клетки продуцируют IL-4 и IL-10 [76]. Будучи антигенпрезентирующими, они могут активировать Т-клетки и направлять их в сторону Th17 дифференциации [77], [81].

2.6. Изучение иммунитета на немодельных организмах

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

2.6.1. Летучие мыши

Летучие мыши обладают большим разнообразием генных сегментов (V, D, J), чем человек, что приводит к более высокому потенциальному разнообразию В-клеточных рецепторов. Для *Myotis Licitugus* было показано отсутствие гипермутаций в вариабельном регионе, из чего может следовать, что летучие мыши в большей степени полагаются на большое количество сегментов при борьбе с инфекциями [82].

Неожиданно большая популяция у Т-лимфоцитов у летучих мышей *P. alecto* постоянно в больших количествах экспрессирует IL-17A, IL-22 или TGFβ, что предполагает сдвиг в сторону Th17 и Treg клеток. В ответ на активацию, количество таких клеток не увеличивалось, но увеличивались в размере популяции клеток экспрессирующих TNF, IL-10, IFNγ, IL-2, гранзим В и перфорин.

В отличие от людей, у летучих мышей в селезенке и периферической крови больше Т-клеток, чем В-лимфоцитов [83].

Молекулы МНСI у летучих мышей способны презентировать более длинные пептиды, чем у других млекопитающих [84]. В антигенсвязывающем кармане этих животных было обнаружено три дополнительных аминокислоты, которые потенциально могут способствовать презентации пептидов с более высокой аффинностью [85].

2.6.2. Рыбы (*Gadus morhua*)

Для некоторых видов рыб было показано отсутствие в геноме генов CD4, МНСII и группы интерлейкинов, традиционно отвечающих за дифференциацию CD4 Т-лимфоцитов. До конца не понятно, как они компенсируют отсутствие хелперных Т-клеток. Например, для *Gadus morhua* было показано наличие большого разнообразия МНС I класса (до 80 различных последовательностей в одной особи). Также есть предположения о наличии особых групп CD8+ лимфоцитов, частично выполняющих классические функции CD4, хотя прямых доказательств этому обнаружено не было [86].

2.6.3. Голый землекоп (*Heterocephalus glaber*)

Изучение *Heterocephalus glaber* представляет особый интерес. Голые землекопы обладают очень высоким соотношением продолжительности жизни к массе тела - при размерах, схожих с мышью, максимальный возраст для которых 4 года [87], [88], эти животные живут до 30 лет [89]. Они также обладают повышенной устойчивостью к раку [90] и не проявляют экспоненциального роста вероятности смерти с возрастом в отличие от других млекопитающих [91]. Все это делает его важным объектом для изучения старения иммунитета.

В селезенке голых землекопов, по сравнению с мышами, меньше Т- и В-лимфоцитов и моноцитов, но больше гранулацитов.

Одно из самых важных отличий - отсутствие у землекопов, в отличие от мышей и людей, клеток естественных киллеров [92]. Особенно неожиданным это

открытие является в совокупности с высокой устойчивостью к раку у этих животных. Однако одной из основных функций естественных киллеров является борьба с вирусными инфекциями. Возможно отсутствие этой популяции можно объяснить особенностями среды обитания. Голые землекопы живут под землей, где эволюционное давление вирусов снижено. Скорее всего, с течением времени, в генах, отвечающих за иммунный ответ естественных киллеров, накапливались инактивирующие мутации, которые впоследствии привели к полной потере этой популяции. В подтверждение этому было показано, что голые землекопы очень неустойчивы к вирусным заболеваниям. В экспериментах с герпесвирусом HSV1 даже небольшие дозы приводили к 100% летальности [93].

Тимус голых землекопов с раннего возраста имеет небольшие размеры, и его соотношение к массе тела ниже, чем у молодых мышей аналогичного возраста. Однако было показано, что с возрастом не наблюдается его инволюции вплоть до 11 летнего возраста. Сам тимус менее заселен клетками, и содержание двойных позитивных клеток и цитотоксических эффекторных Т-клеток ниже, чем у мышей [94]. Селезенка представлена схожими размерами с мышью, однако, также имеет более низкую плотность клеток с фолликулами меньших размеров, содержащими меньше Т- и В-лимфоцитов.

Антибактериальная ветвь иммунитета голых землекопов, напротив, более развита. Что также согласуется с теорией развития их иммунной системы в условиях, в которых они гораздо чаще сталкиваются с бактериями, чем с вирусами. В отличие от мышей, у которых более 90 процентов клеток в селезенке и циркулирующей крови - это лимфоциты, у землекопов, как и у людей, миелоидных клеток больше, чем лимфоцитов [92], [95]. Большая часть этих миелоидных клеток - нейтрофилы, в которых, в частности, можно выделить популяцию с высокой экспрессией CXCR2 и группы антимикробных белков: лактоферрин, ольфа2-микроглобулин и кателицидин. Эта популяция занимает от 1 до 5 процентов всех клеток селезенки [92].

2.7. Слепыш (*Spalax galili*)

Слепыши - это подземные грызуны, принадлежащие суперсемейству Muroidea. Для их среды обитания характерны условия с очень низким содержанием кислорода. В лабораторных условиях слепыши выживают при концентрации кислорода в 3%. Эта способность основанная как на молекулярных механизмах регуляции генов отвечающих за процессы дыхания, так и на морфологическом уровне, объясняется высокой плотностью кровяных сосудов, что приводит к сокращению расстояния диффузии кислорода.

Слепыши обладают очень высокой продолжительностью жизни для своего размера, максимальный задокументированный возраст - 21 год. При этом мыши и крысы, принадлежащие тому же суперсемейству, живут до 4 лет.

Слепыши также проявляют высокую устойчивость к раку, для них не было задокументировано спонтанного возникновения злокачественных новообразований. Механизм устойчивости к раковым заболеваниям отличается от такового у голых землекопов и основан на функциях фибробластов, которые замедляют рост и уничтожают даже подсаженные раковые клетки человека и других млекопитающих [1].

Старение клеток слепышей не сопровождается секрецией канонических факторов воспаления (IL-6, IL-8, IL-1 α , SerpinB2, GRO α , ICAM-1) как при репликативном старении, так и старении индуцированном этопозидом [96]. Вероятно, одной из причин является низкий уровень повреждения ДНК вследствие активных процессов ДНК-репарации у этих животных [96], [97]. Также у слепышей, по видимому, ослаблена позитивная регуляция сигналинга IL-1 α -NF-kB. Для IL-1 было показано участие в позитивной регуляции экспрессии факторов старения у людей [98].

Несмотря на сходство особенностей жизнедеятельности спалакса с голым землекопом, генетически он ближе к таким видам как *Mus Musculus* и *Rattus norvegicus* (Рис. 11) [99], что, в частности, предполагает и объясняет различные генетические подходы к достижению высокой устойчивости к раку и высокой продолжительности жизни.

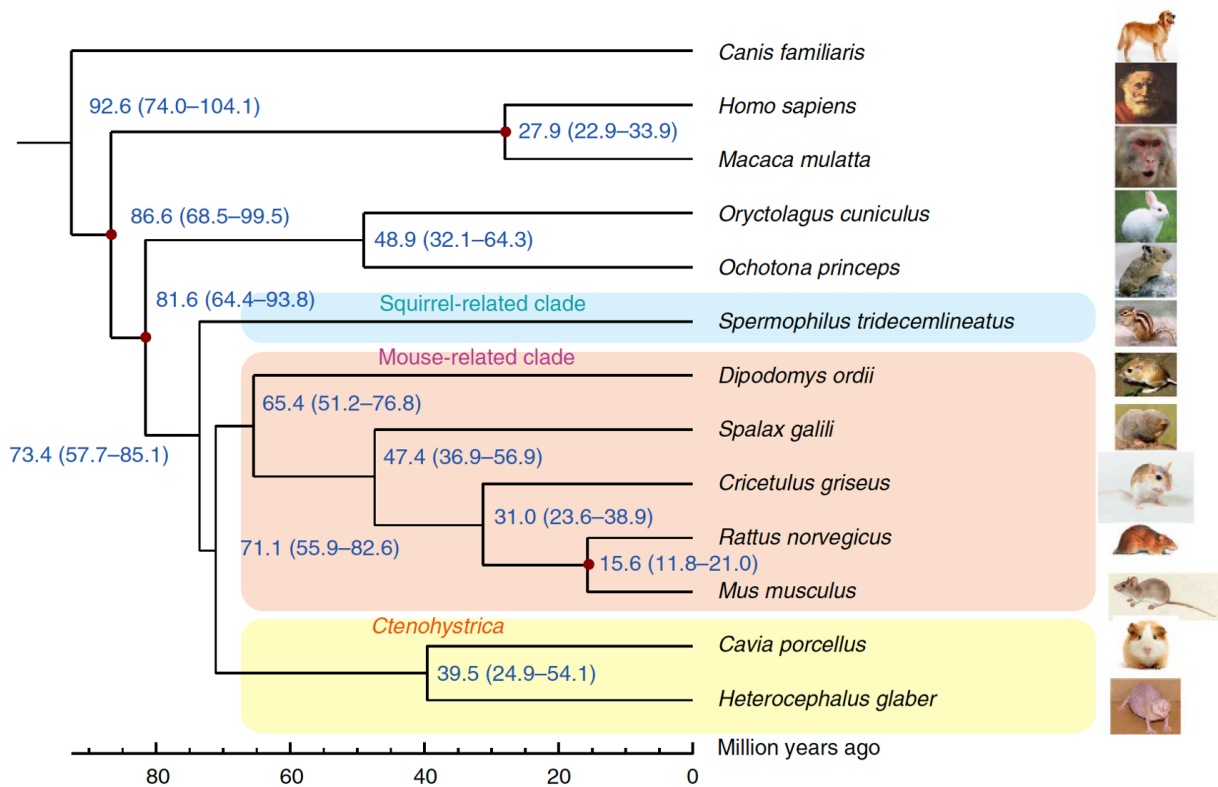


Рисунок 11. Филогенетическое древо с предположительным временем расхождения видов. Время расхождения для слепыша и 12 других млекопитающих подсчитано на основе белков - ортологов. Значение указаны в млн. лет. Цветами отображены три клады грызунов: родственники мыши, *Ctenohystrica* и родственники белки [99].

3. Цели и задачи

Цель: Исследовать молекулярно-генетические характеристики Т- и В-лимфоцитов долгоживущего грызуна *Spalax galili* и их изменения с возрастом.

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.

4. Материалы и методы

4.1. Животные

Слепыши были пойманы в дикой природе и содержались в индивидуальных клетках (45 см x 30 см x 20 см) с подстилкой из опилок. Температура в виварии была 22°C, животных кормили свежими овощами. Возраст взрослых животных определяли как период содержания в виварии до эксперимента плюс два года. Новорожденных животных доставали из норы и определяли их возраст по размеру и другим морфологическим параметрам. Животные умерщвлялись передозировкой анестезии. Спленэктомия проводилась непосредственно после умерщвления. Ткань селезенки была свеж заморожена в жидком азоте и хранилась при -80°C до использования в анализе. Работа со слепышами была проведена под надзором Этического Комитета университета Хайфы. Номера разрешающих протоколов 316/14 и 420/16.

C57BL/6J мыши были куплены в питомнике лабораторных животных “Пушино”. Мыши содержались в стерильных условиях в виварии Института Биоорганической Химии РАН. Работа с мышами была утверждена комиссией по этическому обращению с животными ИБХ РАН в соответствии с Уставом Министерства Здравоохранения РФ. Номер разрешающего протокола 168. Репертуары бета цепей TCR людей были взяты из результатов нашей прошлой публикации [56].

4.2. Магнитно-резонансная томография

МРТ проводилась с использованием 9.4Т томографа открытого типа фирмы Bruker Biospec, с использованием цилиндрической объемной катушки (внутренний диаметр 86мм) для возбуждения поля и одноканальной поверхностной катушки для приема сигнала. Животные находились под анестезией с использованием 1-2% изофлурана с дополнительной подачей

кислорода ($0.5 \text{ Л} * \text{ мин}^{-1}$). Во время процедуры получения снимков проводился контроль дыхания. Сагиттальные T2-взвешенные изображения тимуса были получены используя метод многократного возбуждения с помощью длинной серии (RARE) с респираторным гейтированием и следующими параметрами: толщина 0.7 мм, 30-40 срезов, поле обзора (FOV) $3 \times 3 \text{ см}^2$, размер матрицы 200×200 (пространственное разрешение $150 \times 150 \text{ мкм}^2$), TR/TE (время повторения/ время эхо)=2000/16.2 мс, усреднение сигнала по 5 изображениям. Объем тимуса каждого животного был измерен на основе MPT снимков с использованием программного обеспечения FMRIB Software Library. Измерения были проведены путем ручной сегментации томографии тимуса. Для каждой возрастной группы был посчитан средний объем и стандартное отклонение. Статистическая достоверность была определена при помощи критерия Стьюдента с коэффициентом статистической значимости $P < 0.05$.

4.3. Выделение РНК

Замороженная ткань селезенки слепыша и мышей была гомогенизирована в 900 мкл TRIzol Lysis Reagent (Thermo Fisher Scientific) с использованием жидкого азота. Добавляли в образец 200 мкл хлороформа, интенсивно перемешивали, после чего центрифугировали 20 минут при 13000 об/мин и 4°C . Верхнюю водную фракцию аккуратно отбирали в чистую пробирку и добавляли равный объем (около 500 мкл) iPrOH. Центрифугировали 10 минут при 13000 об/мин и 4°C . Супернатант отбирали и отбрасывали, осадок РНК дважды промывали в 1 мл 80% EtOH. Центрифугировали 4 минуты при 13000 об/мин и 4°C . Супернатант отбирали, осадок РНК высушивали в течение 5 минут при комнатной температуре. РНК растворяли в 30 мкл стерильной, не содержащей РНКаз воды (Qiagen). Концентрацию полученного образца тотальной РНК измеряли на флуориметре Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific). Качество выделенной РНК оценивали электрофоретически.

4.4. Приготовление кДНК библиотек альфа- и бета-цепи TCR и IGH

4.4.1. Синтез первой цепи кДНК

Синтез первых цепей проводили при помощи набора для синтеза кДНК от компании Clontech (США) с использованием обратной транскриптазы SMARTScribe (Clontech). Для каждого образца было использовано по 3 мкг тотальной РНК (1мкг на реакцию). В качестве праймеров для синтеза использовали олигонуклеотиды, специфичные к константным сегментам TCR и иммуноглобулинов. Реакции синтеза для TCR и иммуноглобулинов проводили отдельно. Добавляемый в реакцию SMART-адаптер SmartNNNa использовался для введения универсальной последовательности на конец синтезируемой молекулы кДНК перед последовательностью V сегмента. Обратная транскриптаза SMARTScribe, после завершения синтеза кДНК с матрицы РНК, добавляла на конец новосинтезированной молекулы несколько нематричных цитозинов. SMART-адаптер на 3' конце содержал 4 гуанозинмонофосфата, которые позволяли адаптеру отщепиться на молекуле кДНК. Далее последовательность адаптера воспринималась обратной транскриптазой, как часть матрицы, и синтез цепи продолжался с последовательности этого адаптера. В последовательность SMART-адаптера был включен молекулярный идентификатор (баркод) - последовательность из 12 случайных "N"-нуклеотидов, необходимых для качественной нормировки на количество исходных молекул и исправления ошибок амплификации и секвенирования при биоинформатической обработке. Кроме того, SMART-адаптер содержал 6 дезоксиурацилов, которые удалялись после реакции синтеза урацил-ДНК-гликозилазой (UDG) для того, чтобы избежать возможного участия SMART-адаптера в ПЦР-амплификации. Для повышения сохранности РНК при синтезе первой цепи кДНК, в реакционную смесь также добавляли ингибитор РНКаз rRNasin (Promega).

Таблица 3. Состав реакционной смеси для синтеза кДНК

Компонент	Объем, мкл	Конечная концентрация в реакции
Буфер SMARTScribe, Clontech, 5x	2	1x
DTT, Contech, 20 mM	1	2mM
dNTP, Биосан, 10 mM	1	1mM
rRNasin, Promega, 40 ед/мкл	0.5	0,5 ед/мкл
SMARTScribe, Clontech, 100 ед/мкл	1	10 ед/мкл
SmartNNNa, IDT, 20 мкМ	1	2мкМ
Соответствующая смесь ген-специфичных праймеров	1	1мкМ
РНК	1мкг	
Стерильная вода, Qiagen	Довести до 10 мкл	

Одна реакция включала в себя 10 мкл реакционной смеси в пробирках на 0,2 мл, и на каждый выделенный образец РНК приходилось по три синтеза в 10 мкл (Таб.3). Реакционную смесь инкубировали 60 минут при 42 °С. После этого в реакции добавляли по 1 мкл UDG для удаления оставшихся молекул адаптера SmartNNNa и инкубировали реакции 40 минут при 37°С. После завершения реакции, соответствующие одному донору, объединяли для каждого образца и проводили очистку кДНК библиотек от компонентов реакционной смеси с помощью набора MinElute PCR purification kit (Qiagen) по протоколу производителя. Элюцию ДНК проводили в 14 мкл буфера EB (Qiagen).

4.4.2. Первый раунд ПЦР-амплификации кДНК библиотек

В первом раунде ПЦР использовали весь объем синтезированной и затем очищенной на колонках кДНК. В каждую реакцию объемом 50 мкл в пробирках на 0,2 мл добавляли по 14 мкл кДНК библиотеки (Таб. 4). В качестве прямого праймера для библиотек TCR, на 5' конец библиотеки, использовали step-out смесь олигонуклеотидов Smart20/Step1, в которой 3' конец Smart20 комплементарен последовательности адаптера SmartNNNa, а Step1 комплементарен 5' концу Smart20. Для кДНК библиотек иммуноглобулинов в качестве прямого праймера использовали олигонуклеотид M1ss, комплементарный последовательности адаптера SmartNNNa.

В качестве обратного праймера использовался соответствующий сиквенс специфичный олигонуклеотид, комплементарный константному участку TCR или иммуноглобулинов.

Первую амплификацию проводили на протяжении 21 цикла с предварительным прогревом реакционной смеси на 98°C в течение двух минут. Использовали следующую программу:

- денатурация – 98°C, 10 сек
- отжиг – 60°C, 10 сек
- элонгация – 72°C, 60 сек

После завершения продукты ПЦР очищали на магнитных частицах AMPure XP (Beckman Coulter) по протоколу производителя. Элюцию ДНК с магнитных частиц проводили в 30 мкл буфера EB (Qiagen).

Таблица 4. Состав реакционной смеси для первой ПЦР

Компонент	Объем, мкл	Конечная концентрация в реакции
Буфер для HS Q5, NEB, 5x	10	1x
dNTP, Биосан, 10 mM	1	0.2 mM
HS Q5 ДНК-полимераза, NEB, 2 ед/мкл	0.5	0,02 ед/мкл
Прямой праймер Евроген, 10 мкМ	1	0,2 мкМ
Обратный ген-специфичный праймер, Евроген, 10 мкМ	1	0,2 мкМ
Стерильная вода, Qiagen	22.5	
кДНК	14	

4.4.3. Второй раунд ПЦР-амплификации

Во втором раунде амплификации использовали по 1 мкл очищенного продукта ПЦР на 25 мкл реакции в пробирках на 0,2 мл (Таб. 5). Для амплификации библиотек со стороны 5' конца использовалась праймер M1s_i, в случае библиотек TCR, или M1S для библиотек иммуноглобулинов. Для амплификации библиотек со стороны константного сегмента в случае TCR использовались сиквенс специфичные праймеры со встроенными баркодами для маркировки образцов. Для библиотек иммуноглобулинов использовали step-out праймер Z.

Таблица 5. Состав реакционной смеси для второй ПЦР.

Компонент	Объем, мкл	Конечная концентрация в реакции
Буфер для HS Q5, NEB, 5x	5	1x
dNTP, Биосан, 10 mM	0.5	0.2 mM
HS Q5 ДНК-полимераза, NEB, 2 ед/мкл	0.25	0,02 ед/мкл
Прямой праймер, Евроген, 10 мкМ	0.5	0,5 мкМ
Обратный праймер, Евроген, 10 мкМ	0.5	0,5 мкМ
Стерильная вода, Qiagen	17.25	
кДНК	1	

Реакцию проводили в течение 15 циклов с предварительным прогревом реакционной смеси на 98 °С в течение двух минут. Использовали следующую программу:

- денатурация – 98°С, 10 сек
- отжиг – 60 °С, 10 сек
- элонгация – 72 °С, 60 сек

После завершения амплификации, качество полученных библиотек оценивали электрофоретически в 2% агарозном геле по стандартному протоколу. Образцы объединяли и проводили очистку ДНК от компонентов и

неспецифических продуктов реакции на магнитных частицах AMPure XP (Beckman Coulter) по протоколу производителя. Элюцию ДНК с магнитных частиц проводили в 30 мкл буфера EB (Qiagen).

К полученным библиотекам лигировали адаптеры для секвенирования Illumina с использованием реагентов NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina согласно протоколу производителя.

4.5. Секвенирование библиотек TCR и иммуноглобулинов

Библиотеки TCR, иммуноглобулинов и транскриптомы мышей и слепышей были секвенированы на приборах Illumina MiSeq, Illumina HiSeq 4000, Illumina NextSeq550 и Illumina HiSeq2500. В таблице 1 в приложении представлен полный список отсеквенированных библиотек с полученным количеством прочтений.

Кроме того, в работе были использованы репертуары CDR3 β цепей TCR 65 здоровых людей разного возраста (от пуповинной крови до 103 лет). Репертуары были получены из образцов РВМС, используя аналогичный разработанному нами для слепышей протоколу, описанный в нашей предыдущей работе [56].

4.6. Сравнение метрик разнообразия репертуара TCR

Для сравнительного анализа метрик разнообразия мы использовали данные, ранее опубликованные нашей группой [55]. Тотальная РНК была выделена из образцов периферической крови мышей C57BL/6J двух возрастных групп (3 месяца и 2 года). Репертуары CDR3 β -цепей TCR были получены методом RACE с использованием молекулярного баркодирования (праймеры указаны в таблице 1 в приложении) и отсеквенированы на приборе Illumina MiSEQ.

4.7. Анализ TCR репертуаров

Полученные данные секвенирования кДНК библиотек TCR были обработаны программным обеспечением MiGEC [100] для коррекции ошибок ПЦР и секвенирования при помощи молекулярных баркодов. Затем репертуары TCR были экстрагированы программным обеспечением MiXCR с использованием

встроенного референса для данных мышей и нового референса для слепыша. Эффективность экстракции (процент ридов содержащих CDR3 TCR) оставил 95% и 74% для мышей и 90% и 75% для слепыша TCR альфа и бета цепей соответственно.

Для сравнительного анализа разнообразия TCR репертуар каждого образца был нормирован на 18300 (размер минимального образца) случайно выбранных баркодированных молекул кДНК с использованием программного обеспечения VDJtools. Мы использовали следующие метрики разнообразия:

- наблюдаемое разнообразие нуклеотидных вариантов CDR3 TCR при заданном количестве молекул кДНК;
- нормализованный индекс Шеннона-Винера, характеризующий неоднородность репертуара (степень клональных экспансий) [101];
- индекс Chao1, отражающий распределение клонотипов с низкой частотой [102], [103].

Характеристики CDR3 при анализе были нормализованы на частоту клонов. Такой анализ отражает взвешенные свойства репертуара и несильно зависит от глубины TCR профайлинга, как было показано в нашей предыдущей работе [55].

4.8. Анализ публичности репертуара TCR

Как было показано в наших предыдущих работах [55], [104], пересечение репертуаров - с точки зрения размера клонов и кумулятивных частот общих клонов между любыми двумя образцами - напрямую зависит от количества клонов в образце. Для того, чтобы провести сравнительный анализ, мы нормализовали образцы, взяв 3000 наиболее часто встречаемых клонов в каждом образце. Для каждой пары образцов одного вида и возрастной группы мы посчитали взвешенное пересечение с учетом длины аминокислотной последовательности CDR3 β -цепи (метрика F2) и числа общих аминокислотных последовательностей CDR3 β -цепи в 3000 отобранных клонах.

4.9. Анализ репертуара тяжелых цепей иммуноглобулинов

Полученные данные секвенирования кДНК библиотек иммуноглобулинов слепыша и мышей были обработаны программным обеспечением MiGEC для коррекции ошибок на основе молекулярного баркодирования. Затем образцы были нормализованы на 10000 UMI. Усредненные характеристики CDR3 региона были нормированы на частоты клонов. Частоты изотипов определяли из данных транскриптома, чтобы нивелировать эффект неравномерной амплификации целевых библиотек кДНК. Частоты гипермутации были определены на основе транскриптома при помощи программного обеспечения MiXCR при построении полноразмерного репертуара. Для того, чтобы отличить гипермутации от аллельных вариантов, мы использовали следующие критерии для определения последних:

- мутация должна подтверждаться наличием более, чем в десяти уникальных клонах тяжелой цепи иммуноглобулинов, включающих одинаковый V-сегмент;
- мутация должна определяться хотя в 40% всех клонотипов с заданным V-геном.

4.10. Сборка de novo транскриптома слепыша

Сборка транскриптома из полученных данных секвенирования осуществлялась по методу, описанному в статье Mamro, J. et al. [105].

Адаптеры и риды с низким качеством были удалены, используя Trim Galore и Trimmomatic [106]. Затем данные были собраны с применением трех программ-сборщиков:

- SPAdes с двумя k-мерами длиной 55 и 75 [107]
- Trinity [108]
- Shannon [109]

Результаты работы сборщиков были соединены, повторяющиеся транскрипты удалены, а финальная сборка отфильтрована при помощи

EvidentialGene [110] на основе предсказания биологической значимости транскриптов. После этого качество и полнота транскриптома были оценены при помощи BISCO [111] с последующей функциональной аннотацией. Выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводилось с использованием BLAST+ [112] против базы данных UniprotKB/SwissProt. Поиск белковых доменов осуществляли HMMER/Pfam [113]. Сигнальные пептиды идентифицировали с использованием SignalP [114]. Трансмембранные домены предсказаны TMHMM [115]. Итоговые результаты были отфильтрованы на основе значения e-value ($\leq 1 \times 10^{-5}$).

4.11. Получение кДНК библиотек транскриптома

Тотальная РНК была выделена из замороженных образцов селезенки мышей и слепыша четырех возрастных групп. По 1 мкг РНК из каждого образца было использовано для приготовления кДНК библиотеки с использованием набора реагентов TruSeq Stranded mRNA HT Sample Prep Kit (Illumina). Затем полученные библиотеки были секвенированы с парным прочтением (Приложение Таб. 2). Полученные прочтения были обрезаны до 100 п.о., нуклеотиды с плохим качеством и адаптеры были удалены с использованием Trimmomatic [106]. Риды были выровнены на референс с использованием Bowtie2 v.2.3.4.1 [116], и экспрессия посчитана при помощи RSEM v.1.3.0 [117]. Для транскриптома мышей был использован референс GRCm38 (mm10). Для образцов слепыша мы использовали два референса: S.galili_v1.0 [118] и референс, собранный нами de novo. Для сравнительного анализа использовали значения TPM (число транскриптов на миллион п.о.), чтобы нивелировать различия в глубине секвенирования и длине генов. Для того, чтобы получить итоговую матрицу экспрессии для слепыша, мы дополнили данные, полученные S.galili_v1.0, значениями TPM, полученными с использованием нового референса. При добавлении или замене данных в S.galili_v1.0 мы использовали следующие критерии:

- ген ортолог мыши\человека не обнаруживался в S.galili_v1.0;

- разница в длине гена между двумя референсами составляла более 20% от S.galili_v1.0, разница между длиной гена в нашем референсе и мышинном референсе была меньше, чем разница с S.galili_v1.0, и разница в экспрессии (TPM) между нашим референсом и S.galili_v1.0 была больше 20%.

Аннотация добавленных генов, а так же генов ключевых маркеров Т- и В-лимфоцитов, транскрипционных факторов и контрольных точек проверялась вручную. Итоговая таблица с генами слепыша включает в себя 15184 гена, из которых 1590 генов были дополнены из нашего референса. Для межвидового сравнительного анализа гены ортологи (14707 штук) были определены при помощи R библиотеки biomaRt [119]. Дифференциальная экспрессия генов была посчитана на основе критерия Уилкоксона с поправкой Бенджамини-Хохберга (с использованием значений TPM) для 9 образцов слепышей и 9 образцов мышей (без образцов новорожденных особей). Для отобранных Т-клеточных генов экспрессия была нормализована путем деления значения TPM на среднюю экспрессию генов Cd3d, Cd3e и Trbc1.

5. Результаты

Для решения поставленных задач мы разработали метод получения кДНК библиотек иммунных рецепторов, основываясь на гомологии константных сегментов генов α - и β -цепей TCR, и тяжелой цепи иммуноглобулинов. Полученные библиотеки были использованы для создания референса T- и B-клеточных генных сегментов.

Используя разработанный метод и референс, мы провели сравнительный анализ репертуаров слепыша, человека и мыши в четырех возрастных группах (Таб. 6).

Затем мы подготовили кДНК библиотеки транскриптомов слепыша и мыши в 4 возрастных группах. На основе наших данных, ранее опубликованного референса и генома слепыша, мы создали референс для работы с транскриптомом слепыша, включающий 16736 генов. Далее мы провели сравнительный анализ уровней транскрипции генов, вовлеченных в развитие и функционирование иммунной системы у слепыша и мышей, для 4 возрастных групп.

Таблица 6. Количество организмов разных видов и разных возрастных групп, использованных в данной работе. В скобках указано суммарное количество особей (n), а также количество особей разного пола (м/ж).

Возрастная группа	Человек	Мышь	Слепыш
Новорожденные	Пуповинная кровь (n=8, м=3, ж=5)	Новорожденные (n=7)	5-21 день (n=10)
Молодые	20-30 лет (n=6, м=4, ж=3)	3 месяца (n=5, ж=5)	4-5 лет (n=5, ж=5)
Взрослые	30-70 лет (n=26, м=10, ж=16)	1 год (n=4, ж=4)	7-10 лет (n=5, ж=5)
Старые	>80 лет (n=21, м=6, ж=15)	>2 лет (n=5, ж=5)	>12 лет (n=6, ж=6)

5.1. Подбор метода оценки разнообразия иммунных репертуаров

Определение полного разнообразия Т-клеточных рецепторов является нетривиальной задачей, ограниченной размерами образца и ограничениями методов экстраполяции [4]. Кроме того, сравнение образцов между собой осложнено тем, что большинство используемых метрик разнообразия зависят от глубины анализа [120], которая часто варьируется от образца к образцу даже в стандартизованных экспериментах. Для нивелирования различной глубины секвенирования при сравнении образцов используют различные методы нормировки. Наиболее эффективной считается нормировка на количество исходных молекул с использованием молекулярного баркодирования [121]–[123], так как нормировка на количество прочтений не учитывает различную скорость амплификации для разных молекул кДНК. Кроме того, использование молекулярных баркодов позволяет корректировать мутации, возникающие во время амплификации.

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 Т-лимфоцитов (CD62L+CD44-) при помощи проточной цитометрии с окрашиванием поверхностных маркеров. Учитывая, что у мышей разнообразие Т-клеточного репертуара снижается с возрастом из-за уменьшения доли наивных Т-лимфоцитов, мы посчитали корреляцию между различными метриками разнообразия и возрастом, а также между метриками и процентом наивных Т-клеток, используя это как метод определения точности конкретной метрики.

Было разработано программное обеспечение VDJviz для статистического анализа и визуализации характеристик иммунных репертуаров, полученных с использованием ранее разработанных пакетов MiXCR и MiGEC. Данный пакет

включает подсчет используемых в данной работе метрик разнообразия репертуаров.

При анализе данных мы использовали наиболее распространенные метрики разнообразия: Шеннона-Винера [124], Симпсона [125], Эфрона [126], индекс D50, Chao1 [102], экстраполированный индекс Chao [127] и прямое наблюдаемое разнообразие (Рис. 12). Каждая метрика была посчитана для четырех вариантов анализа данных: полные данные с и без коррекции ошибок на основе UMI, данные, нормализованные на 15000 молекулярных баркодов (размер минимального образца) с коррекцией ошибок, и данные, нормализованные на 15000 прочтений без коррекции.

Индекс d50 не коррелировал как с возрастом так и с процентом наивных клеток, однако, коррекция ошибок немного увеличивала корреляцию с процентом наивных клеток. Большинство других метрик разнообразия лучше коррелировали с процентом наивных T-клеток, чем с возрастом животных. Разнообразие напрямую зависит от процента наивных клеток, на который в свою очередь влияет как возраст, так и ряд других факторов. При этом в среднем для большинства метрик коррекция ошибок и нормализация увеличивали корреляцию с процентом наивных клеток (Рис. 12).

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.

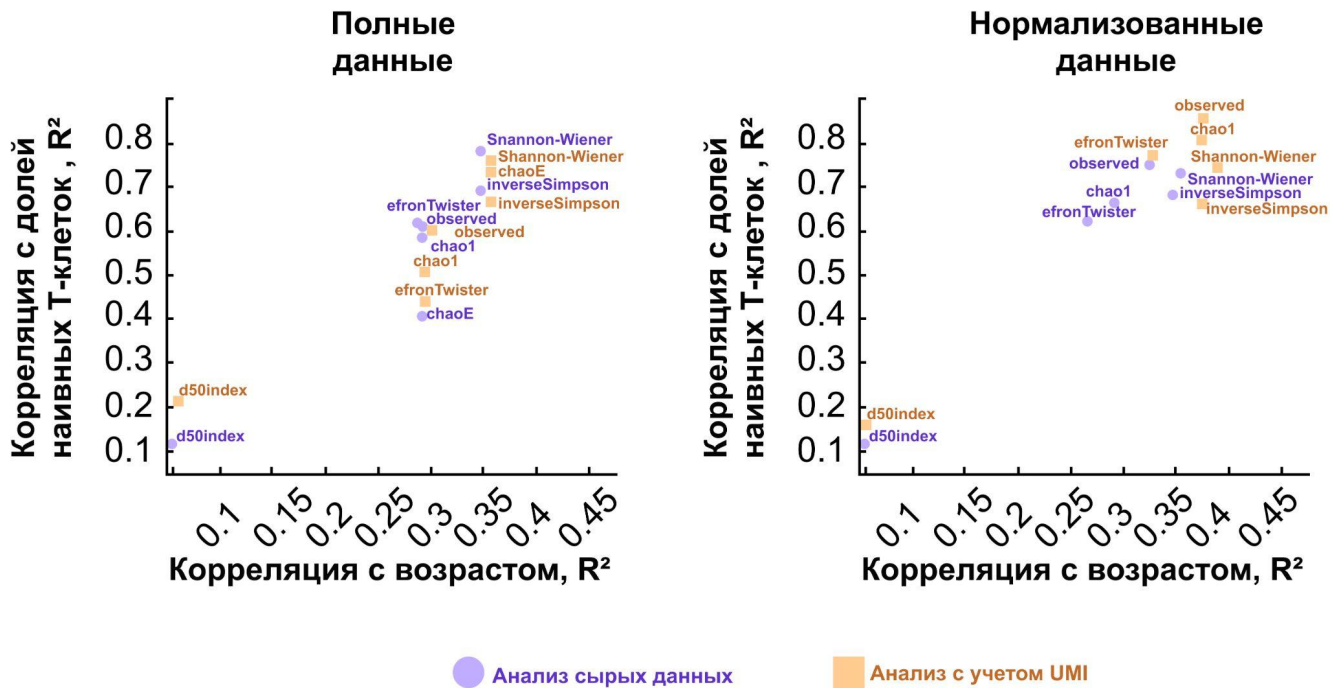


Рисунок 12. Корреляция Спирмена метрик разнообразия CDR3 β TCR в периферической крови у молодых и старых мышей с возрастом и процентом наивных клеток. Фиолетовые маркеры - данные обработаны MiXCR. Оранжевые маркеры - данные обработаны с коррекции ошибок секвенирования на основе UMI (MiGEC + MiXCR). Слева в анализ были взяты все доступные UMI группы / риды в каждом образце. Справа данные были нормированы на 15000 UMI \ 15000 ридов.

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

Для того, чтобы проанализировать разнообразие и другие свойства репертуаров TCR и тяжелых цепей иммуноглобулинов, мы разработали методы получения кДНК библиотек соответствующих генов. За основу мы взяли ранее созданный нами протокол для создания полноразмерных кДНК библиотек генов TCR и BCR у человека и мыши [128]–[130].

Сиквенс 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 данными транскриптома слепыша [131].

Для иммуноглобулинов были подобраны изотип-специфичные праймеры для IgA, IgG и IgM на соответствующие участки каждого из С генов.

Разработанные праймеры (Приложение Таб. 1) были использованы для приготовления кДНК библиотек TCR и иммуноглобулинов по технологии 5'RACE со сменой матрицы [132] и молекулярным баркодированием. (Рис. 13-15) Молекулярные баркоды встраивались на стадии синтеза 1-й 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.

После синтеза 1-ой цепи кДНК продукт реакции амплифицировали с использованием двух последовательных ПЦР, таким образом, что на финальной стадии в последовательность библиотек по обоим концам молекулы встраивались уникальные пары баркодов для каждого образца. На рисунке 13 показан пример электрофореза в агарозном геле полученных кДНК библиотек, на котором видно получение чистого продукта ожидаемого размера.

Такой метод может быть использован как для получения полноразмерных прочтений генов TCR и BCR, так и покрывающих только участок CDR3, при этом сохраняя преимущества использования молекулярных баркодов и уменьшая затраты на секвенирование за счет меньшей длины прочтения одного из ридов.

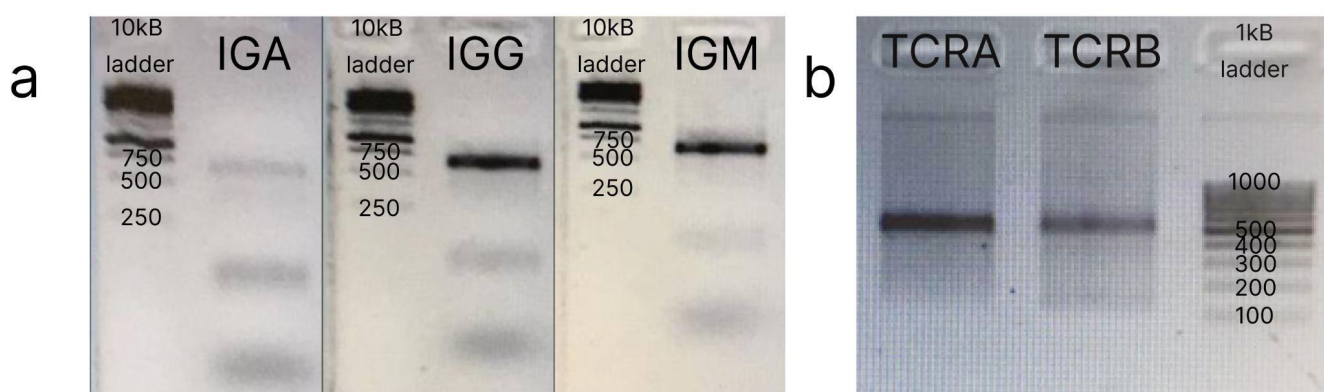


Рисунок 13. Электрофорез кДНК библиотек генов IGH и α и β цепей TCR в 2% агарозном геле. Длина продукта составляет около 600 п.о. **а.** кДНК библиотеки тяжелых цепей иммуноглобулинов. **б.** кДНК библиотеки генов цепей TCR.

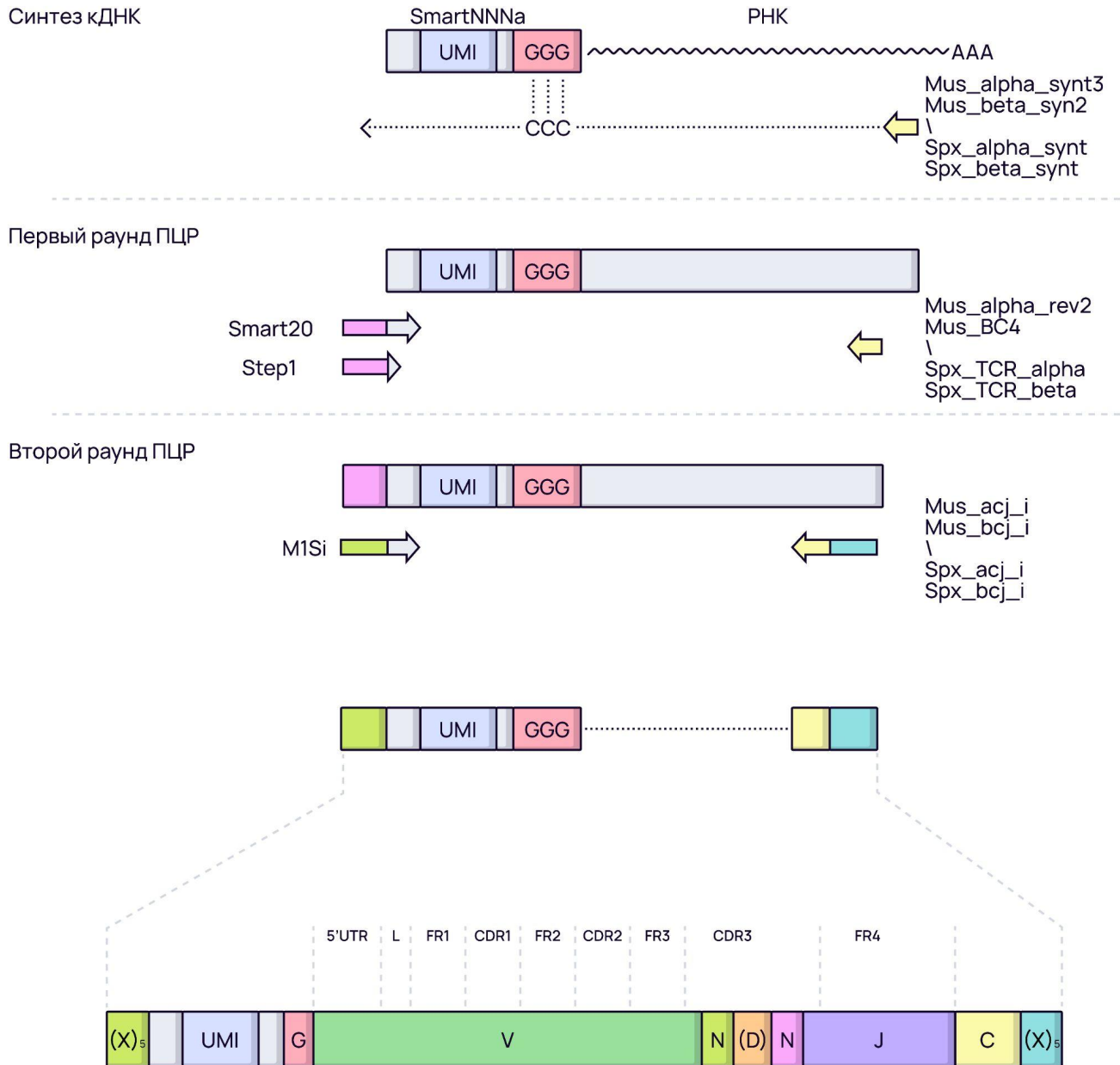


Рисунок 14. Схема приготовления библиотек кДНК TCR. Метод основан на технологии 5'RACE со сменой матрицы. На этапе синтеза кДНК каждая молекула помечается молекулярным баркодом (UMI). Затем идет первый раунд ПЦР с системой степ-аут (Smart20/Step1) и обратными праймерами для α - и β -цепей комплементарными участку соответствующего С гена. Во втором раунде ПЦР по краям ампликона вводятся уникальные баркоды образцов длиной в 5 нуклеотидов с каждого конца. Последовательности всех олигонуклеотидов указаны в приложении в таблице 1.

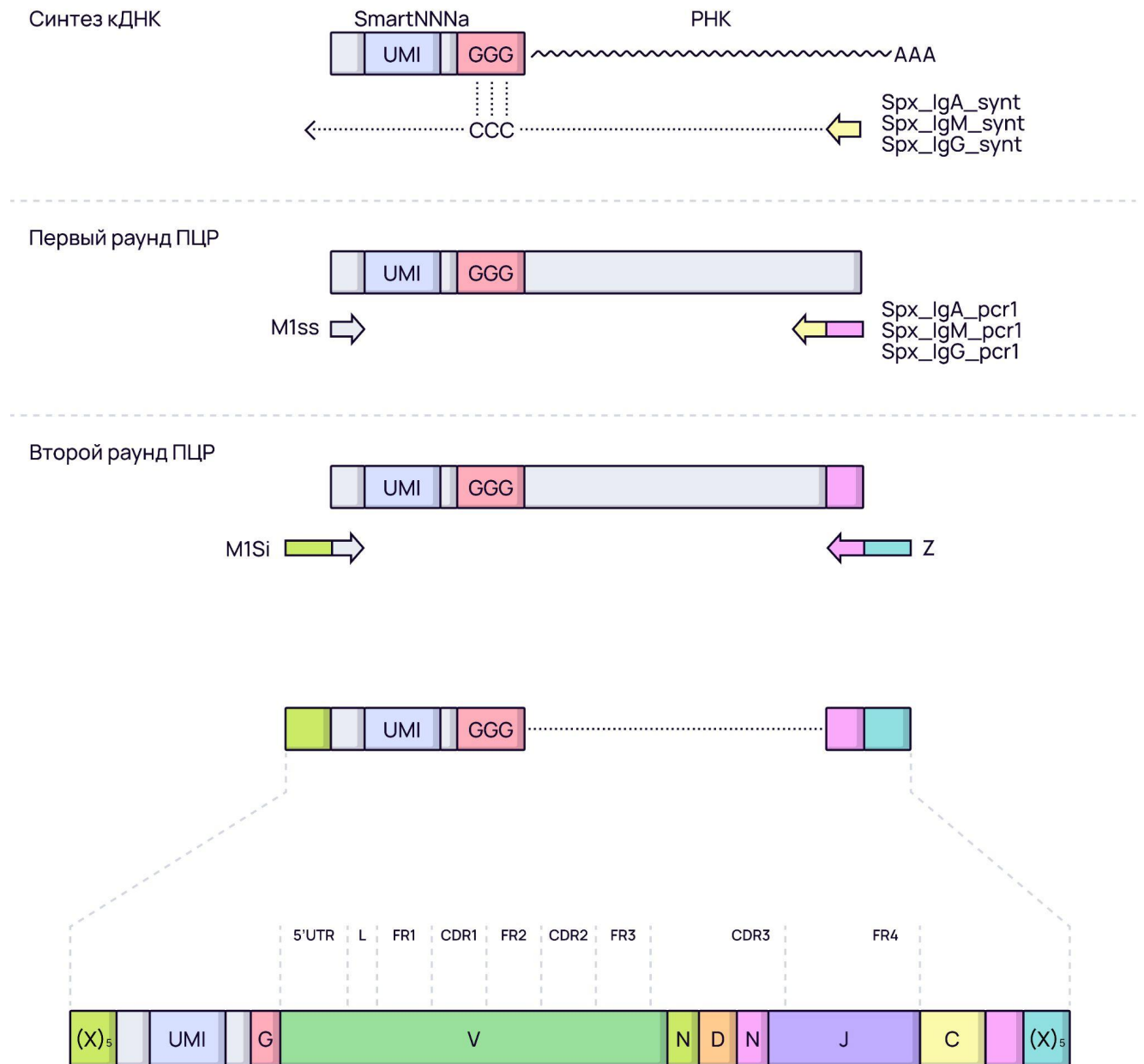


Рисунок 15. Схема приготовления библиотек кДНК тяжелых цепей иммуноглобулинов. Метод основан на технологии 5'RACE со сменой матрицы. На этапе синтеза кДНК каждая молекула помечается молекулярным баркодом (UMI). Затем идет первый раунд ПЦР с прямым праймером, комплементарным адаптеру SmartNNNA, и обратными праймерами для разных изоформ, комплементарными участку соответствующего С гена. Во втором раунде ПЦР по краям ампликона вводятся уникальные баркоды образцов длиной в 5 нуклеотидов с каждого конца. Последовательности всех олигонуклеотидов указаны в приложении в таблице 1.

5.3. 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 (Приложение Таб. 2). Полученные в результате этого прочтения были выровнены на геном слепыша [99], используя алгоритм Барроуза-Уилера [133]. Участки с десятикратным покрытием и выше были использованы для поиска специфических маркеров сегментов генов TCR и иммуноглобулинов, например, два экзона и рекомбинационный сигнал RSS (RSS мышей доступны на сервисе www.imgt.org) для переменного сегмента, или один экзон и два RSS для D и J сегментов. Геномные координаты всех сегментов были определены и обработаны программным обеспечением Repseqio (<https://github.com/repseqio/repseqio>) для анализа качества экстрагированных генов, аннотации регионов FR и CDR, и создания интегрированного в MiXCR референса. При создании референса использовались как данные 5'RACE библиотек так и данные транскриптомов (Приложение Таб. 2). Кроме того, используя ранее опубликованные данные мы сконструировали референс для крысы [134].

Мы идентифицировали 51 функциональный ген TRAV и 21 функциональный ген TRBV у слепыша, которые были объединены в 16 TRAV и 18 TRBV подгрупп, соответственно. Функциональность генов определялась согласно IMGT (отсутствие стоп кодонов и сохранение рамки считывания в местах сочленения).

Качество полученного референса было оценено, исходя из процента успешно выровненных на него исходных прочтений в каждом образце. В среднем около 80-90% прочтений в образцах слепыша успешно выравнивались на последовательности генов в референсе, что сравнимо с данными для референса человека и мыши.

5.4. 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. Используя программное обеспечение MEGA X [135], мы реконструировали филогенетические деревья.

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. Функциональный ген мышей и крыс TRBV23 у слепыша, по всей видимости, является псевдогеном (Рис. 16). Как и у мышей, группа генов TRBV12 у слепыша представлена дублированными вариантами, включая псевдоген. Несколько TRAV генов мышей отсутствуют у слепыша и крысы (TRAV1, TRAV2, TRAV8, TRAV10, TRAV11 и TRAV17). Кроме того, группы генов TRAV7, TRAV9, TRAV12 и TRAV13 содержат в себе меньше генов, чем у мышей и крыс.

Количество генов TRAV у слепыша было значительно ниже, чем у мыши и на 7 генов меньше, чем у крысы. Количество сегментов TRBV, TRBJ и TRBD очень схоже между тремя видами (Рис. 17).

Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей функциональных генов IGHV слепыша показал, что эти гены эволюционно ближе к крысе, чем к мышке. Однако мы обнаружили значительно меньшее количество генов IGHV по сравнению с мышью и крысой, в то время как остальные сегменты присутствовали в сравнимом количестве. Гены IGHA, IGHM и IGHE обладают высокой гомологией с ортологами у мыши и крысы, в то время как гены IGHG находятся в стороне на филогенетическом дереве.

Один из наиболее эволюционно древних изоформ - IGHM [136], представлен двумя копиями. В то же время в геноме слепыша отсутствует другой эволюционно консервативный ген - IGHD, что было показано и для некоторых других млекопитающих [137].

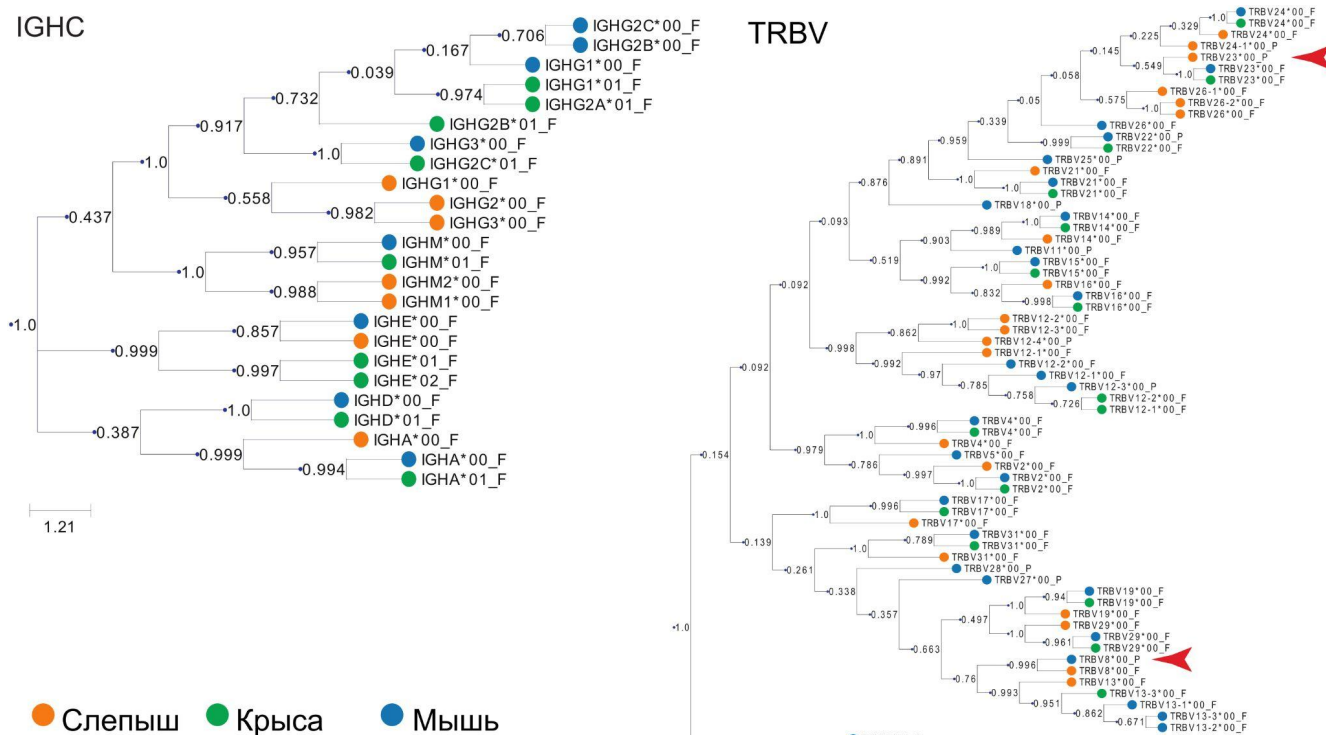


Рисунок 16. Сравнительный филогенетический анализ генов IGHC и TRBV для слепыша, мыши и крысы. Красной стрелкой показаны гены, являющиеся псевдогенами у одного вида и функциональными у другого. Деревья сконструированы при помощи программного обеспечения MEGA X [135].

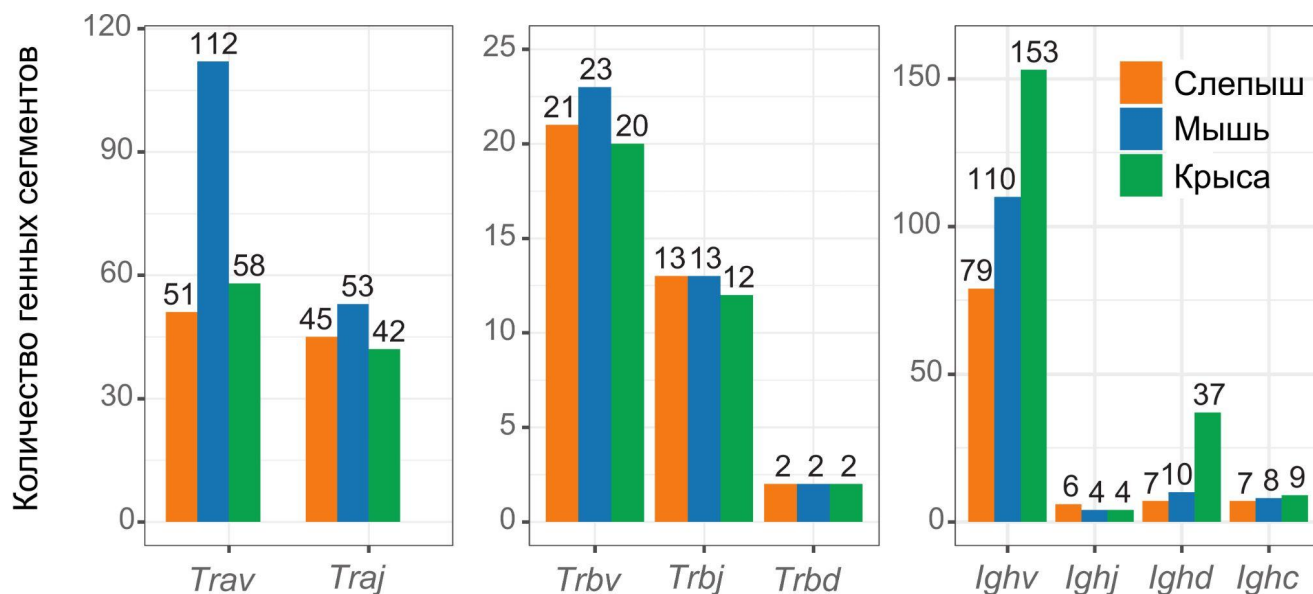


Рисунок 17. Сравнительный анализ числа генных сегментов TCR и IGH в геномном локусе. Учитывались только функциональные гены.

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

5.5. Разнообразие TCR у слепыша не меняется с возрастом

Получив референсные последовательности для всех сегментов генов T- и B-лимфоцитов слепыша, мы решили проследить изменения разнообразия репертуаров TCR и BCR с возрастом. Для этого мы проанализировали репертуары альфа- и бета-цепей TCR в 17 особях слепышей (в возрасте от 0 до 17,5 лет) и 19 мышах (в возрасте от 0 до 2 лет) (Приложение Таб.2). Кроме того, мы также добавили в сравнительный анализ данные репертуаров бета-цепей TCR 62 здоровых людей разного возраста (из пуповинной крови новорожденных, и периферических мононуклеарных клеток крови (PBMC) людей в возрасте до 100 лет). Поскольку данные были получены с применением уникальных молекулярных баркодов (UMI), мы смогли нормализовать репертуары всех образцов на одинаковое количество исходных молекул кДНК. Такой подход позволил нам сравнить образцы не только между особями разного возраста одного вида, но также сравнить разнообразие репертуаров TCR особей между видами.

Как и ожидалось, разнообразие репертуаров альфа- и бета-цепей TCR у мыши и человека снижается с возрастом (Рис. 18). Разнообразие TCR слепыша, напротив, оставалось постоянным независимо от возраста, притом, что изначальное разнообразие у новорожденных слепышей немного ниже, чем в образцах новорожденных мышей и пуповинной крови у людей. Это говорит о том, что с возрастом у слепыша не образуются крупные экспансии эффекторных T-клеток и клеток памяти.

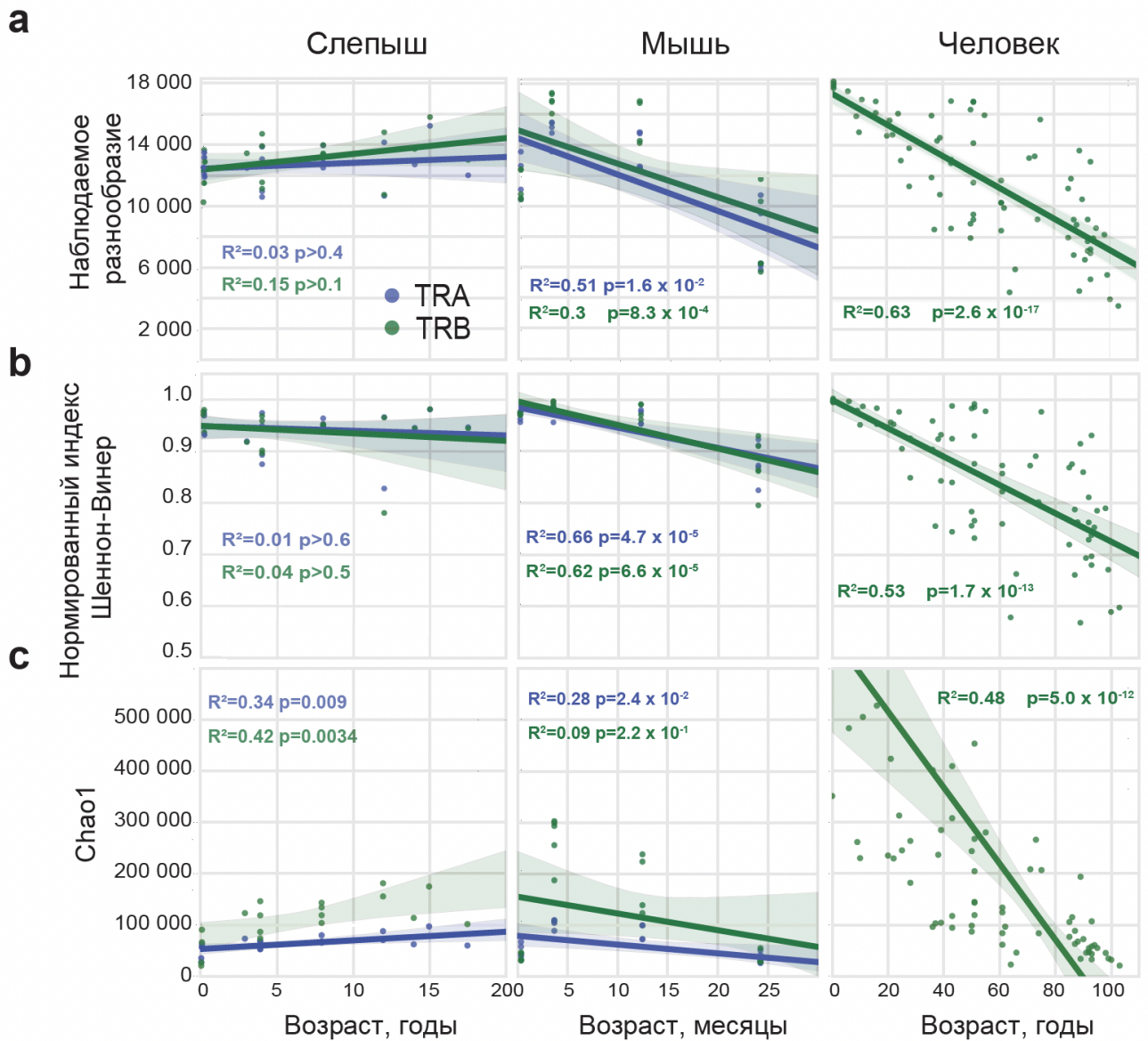


Рисунок 18. Изменение разнообразия CD3 α - и β -цепей TCR у слепыша, мыши и человека с возрастом. Все данные были нормализованы на одинаковое количество UMI. (a) наблюдаемое разнообразие, (b) нормализованный индекс Шеннона-Винера, (c) Chao1. Линии на графике представляют линейную регрессию, рассчитанную 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 [56].

5.6. Тимус слепыша инволюирует с возрастом

Поскольку одним из важнейшим из важнейших проявлений процессов старения Т-клеточного иммунитета является инволюция тимуса с возрастом,

которая приводит к снижению продукции новых наивных Т-клеток, мы сравнили тимус молодых и старых особей слепыша.

Мы изучили размер тимуса, чтобы проверить, не является ли отсутствие его инволюции причиной устойчивого разнообразия репертуара TCR у слепыша. При помощи магнитного резонанса (MRI) мы изучили размер тимуса у молодых (2-3 года) и старых (10-12) особей. Ткань тимуса была подтверждена гистологически. В пределах этих двух возрастных групп мы обнаружили уменьшение размера тимуса примерно в 3.5 раза (Рис. 19); аналогичная динамика была показана и для мышей [138].

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.

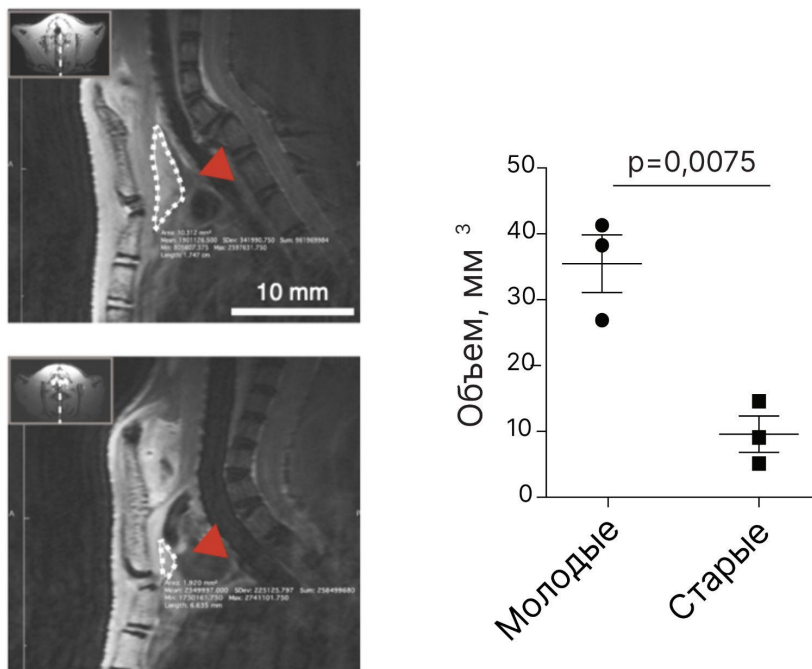


Рисунок 19. Слева снимки МРТ тимуса молодого (сверху, возраст менее 3 лет) и старого (снизу, возраст более 9 лет) слепышей. Красной стрелкой обозначен обведенный пунктирной линией тимус. Справа, статистическое сравнение объема тимуса, подсчитанного на основе снимков МРТ для 3 молодых и 3 старых особей. P-value посчитан двусторонним t-критерием Стьюдента.

5.7. 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) (Рис. 20). У слепыша, как и у мыши, наблюдалась значительная разница в длине CDR3 региона и количестве добавленных N нуклеотидов между группой новорожденных животных и всеми остальными возрастами. Это указывает на то, что TdT, как и у мышей, не экспрессируется у слепышей до рождения, в отличие от людей.

Количество добавленных N нуклеотидов в молодом, взрослом и старом возрасте у слепыша больше, чем у мышей и чуть меньше, чем у человека. Теоретически из этого следует усложнение TCR репертуара, однако наблюдаемое разнообразие 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 CDR3 β показал, что количество общих клонов у слепышей также в среднем ниже, чем у мышей, следовательно низкое разнообразие нельзя объяснить конвергентной рекомбинацией. Вероятно все эти наблюдения свидетельствуют о клональности наивного репертуара Т-лимфоцитов у слепыша. Еще одной причиной низкой публичности клонов при умеренном индивидуальном разнообразии может быть высокое разнообразие главного комплекса гистосовместимости в популяции слепыша [139], [140]. Однако было показано, что высокое разнообразие МНС не оказывает значительного влияния на количество общих клонов между индивидуальными репертуарами [141].

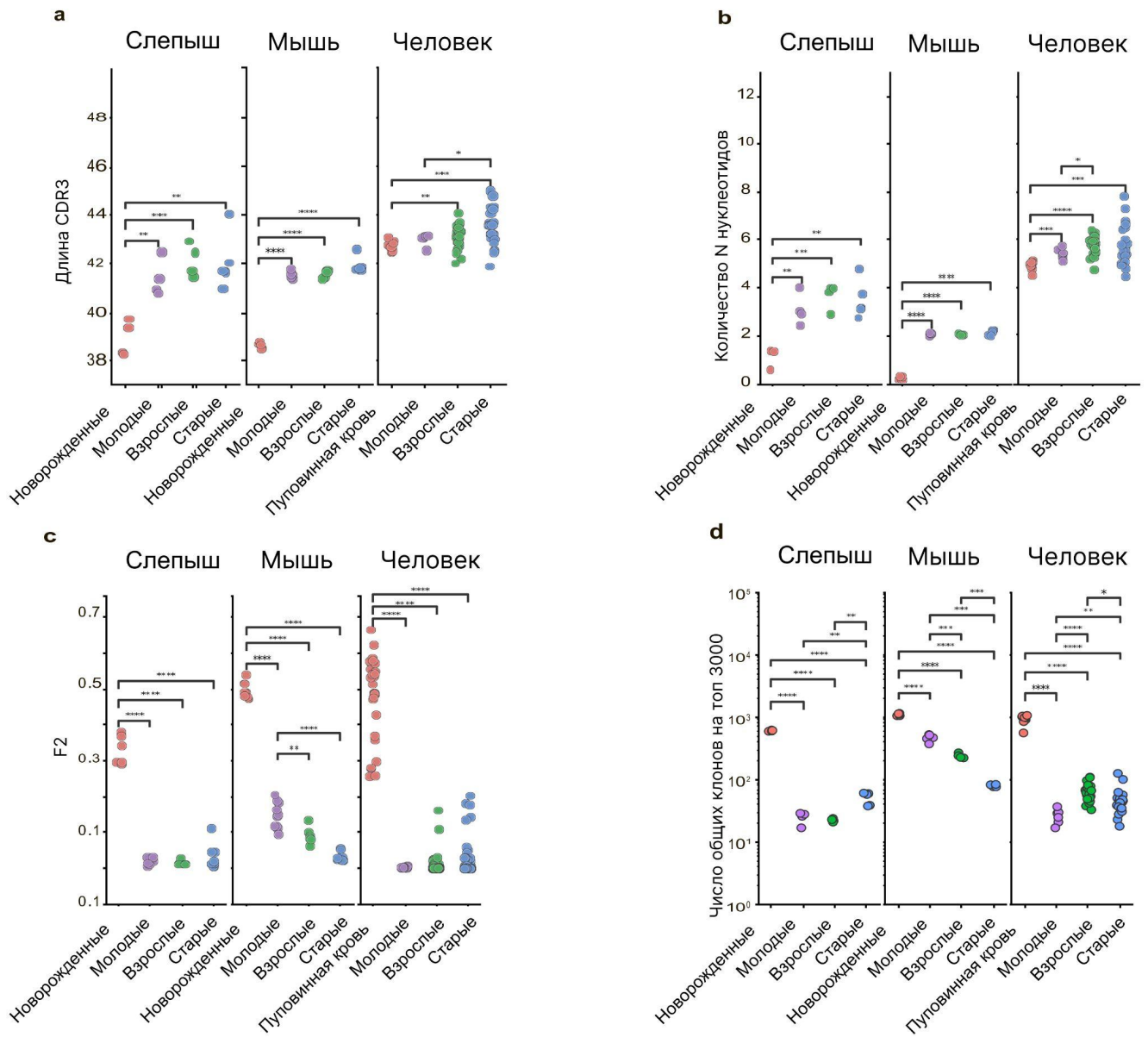


Рисунок 20. Характеристики репертуаров CDR3 β цепей TCR для 4 возрастных групп слепыша, мыши и человека. **(а)** Средняя длина CDR3 β . **(б)** Среднее количество добавленных N-нуклеотидов в CDR3 β . **(с и д)** Публичность репертуаров. Для каждой пары образцов в пределах одного вида и возрастной группы мы посчитали пересечение аминокислотных последовательностей CDR3 β в 3000 клонов с наиболее высокой частотой, принимая во внимание размер клонов. **(с)** F2 метрика - сумма средних геометрических значений частот попарно пересекающихся клонов. **(д)** 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

Мы также проанализировали биофизические свойства CDR3 региона, основанные на аминокислотном составе центральной его части, наиболее часто вовлеченной во взаимодействие с пептидом, презентированным молекулой MHC.

Для всех свойств динамика изменений с возрастом повторяла тренд у мышей и у людей. Так как мыши, в отличие от людей и слепышей, являются линейными животными и несут одинаковые аллели МНС, дисперсия значений у них была ниже.

Суммируя данные анализа свойств репертуара TCR у слепышей, можно сделать предположение, что наивные Т-лимфоциты обладают более высокой клональностью по сравнению с мышами и человеком.

5.8. 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 МНС комплексами (MR1 и CD1) [142]. Наиболее распространенная популяция MAIT клеток у мышей и людей экспрессирует рецептор, α -цепь которого образована в результате рекомбинации TRAV1 и TRAJ33a сегментов, при этом TRBV могут относиться к разным семействам [143], [144].

Для того, чтобы определить наличие подобных инвариантных Т-клеток слепыша и сравнить их с мышью, мы воспользовались стратегией кластерингового анализа, описанной в работе Madi et al. [145]. Для начала мы отобрали 3000 наиболее публичных клонов по аминокислотной последовательности CDR3 α цепи. (Рис. 21) Критерием публичности было количество вариантов нуклеотидной последовательности CDR3 α (одинаковые нуклеотидные последовательности CDR3 в разных особях считались, как отдельные варианты, так как их образование шло независимо). При анализе CDR3, в рекомбинации которых участвовали TRAV1 и TRAJ33a сегменты у мышей, самыми распространенными аминокислотными последовательностями CDR3 α цепи были CAVRDSNYQLIW, на которые пришлось 24 различных варианта нуклеотидной последовательности, и CAVMDSNYQLIW, закодированный 20

разными вариантами. Обе эти последовательности являются известными мышинными CDR3 α цепей MAIT клеток. Далее мы провели кластеризацию всех отобранных публичных клонов, основанную на расстоянии Хэмминга равном 1 [146]. Полученный граф содержит еще одну известную последовательность CDR3 α цепей клеток MAIT - CALRDSNYQLIW, в формировании которой участвуют сегменты TRAV12-1 и TRAJ33. Также среди альфа-цепей состоящих из сегментов TRAV11 и TRAJ18 мы обнаружили каноническую альфа-цепь iNKT клеток мышей - CVVGDRGSALGRLHF, представленную 84 различными уникальными нуклеотидными событиями [147].

В геноме слепыша мы не обнаружили сегментов гомологичных TRAV1 и TRAJ18. Перечисленные выше аминокислотные последовательности CDR3 альфа-цепей TCR популяций клеток MAIT и iNKT мышей не были обнаружены среди публичных клонов у слепыша.

В то же время некоторые аминокислотные последовательности CDR3 α цепей были общими у обоих видов; общие последовательности были также обнаружены среди 3000 самых распространенных публичных вариантов. Стоит отметить, что среди общих CDR3 α из числа самых распространенных публичных клонов наиболее часто встречался сегмент TRAJ40. В предыдущих работах было показано, что TRAJ40 может являться альтернативой TRAJ33 у MR-1 реактивных Т-клеток мышей с нокаутом TRAJ33 [148]. Последнее наблюдение может говорить о наличии у слепыша ранее неописанных кросс-видовых инвариантных последовательностей альфа-цепи TCR.

Суммарно 4175 аминокислотных последовательностей CDR3 α цепи TCR были общими среди 278168 и 300764 уникальных аминокислотных последовательностей у мыши и слепыша соответственно. 7677 аминокислотных последовательностей CDR3 бета цепи TCR были общими среди 152618 и 166712 уникальных аминокислотных последовательностей у мыши и слепыша соответственно. Несмотря на более высокое разнообразие, характерное для бета-цепи в силу наличия D-сегмента, доля общих клонов бета-цепи между мышью и слепышом в 6 раз больше, чем для альфа-цепи. Эти одинаковые

последовательности CDR3 TCR могут распознавать общие антигены, образованные от эволюционно консервативных патогенов [149].

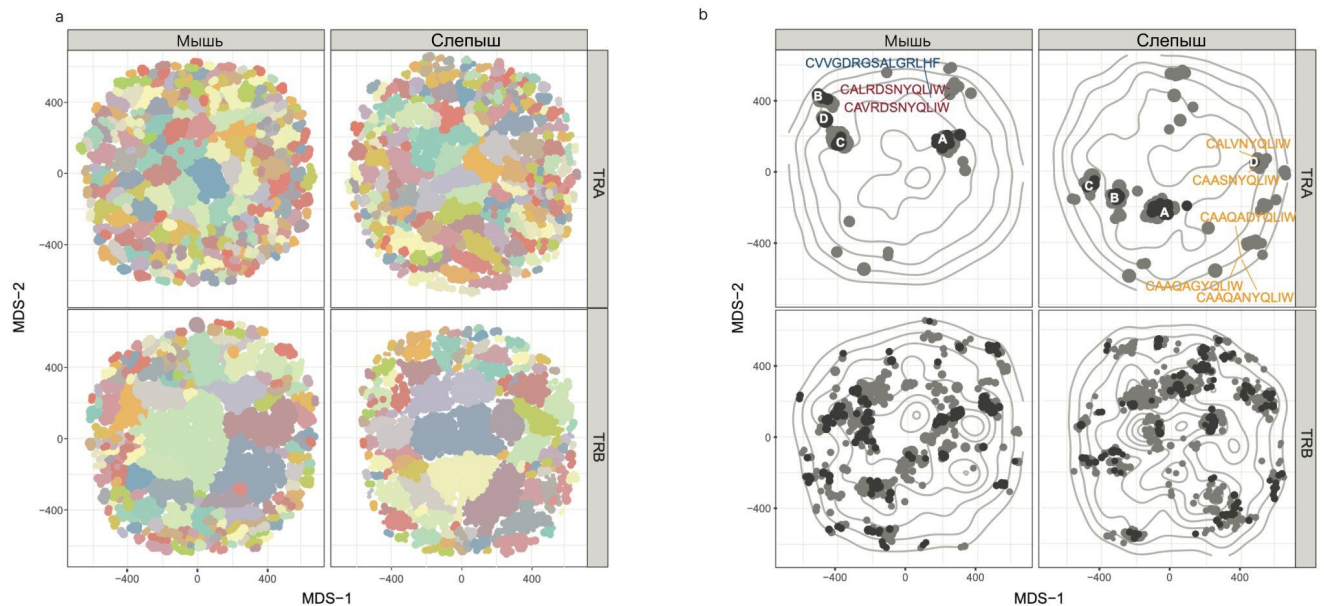


Рисунок 21. (а) График наиболее часто встречающихся 3000 публичных аминокислотных последовательностей CDR3 для мыши и слепыша. Цветами показаны кластеры клонов, внутри которых расстояние Хемминга между последовательностями CDR3 меньше или равно 1. (б) Серые точки показывают кластеры, одинаковые для обоих видов. Черные точки показывают общие для двух видов кластеры, клоны которых входят в топ 3000 в обоих видах. Красным подписаны мышинные TCR α CDR3 MAIT клоны. Синим показана аминокислотная последовательность CDR3 последовательность TCR iNKT. Оранжевым подписаны 5 публичных CDR3 TCR α TRAJ 33 с наибольшей частотой. Буквами A-D помечены одинаковые кластеры. Координаты клонов получены при помощи многомерного шкалирования (*англ. Multidimensional scaling, MDS*) таким образом, что расстояние на двумерном графике отражает истинное расстояние между последовательностями CDR3. Для графика использовались образцы 19 мышей и 17 слепышей.

5.9. Тестирование антител к поверхностным маркерам Т- и В-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 видов. Выравнивания нуклеотидных последовательностей показали, что гены, кодирующие основные поверхностные маркеры у слепыша, обладают высокой гомологией с мышью и крысой (Рис. 22). Мы подобрали палитру доступных межвидовых кросс-реактивных антител, в том числе против антигенов мыши и крысы, которые должны разделять Т-клеточные и В-клеточные популяции. Для некоторых маркеров было выбрано несколько антител с различными эпитопами. Так же были отобраны кросс-видовые антитела, специфичные к наиболее консервативным эпитопам (полный список протестированных антител приведен в приложении в таблице 3) .

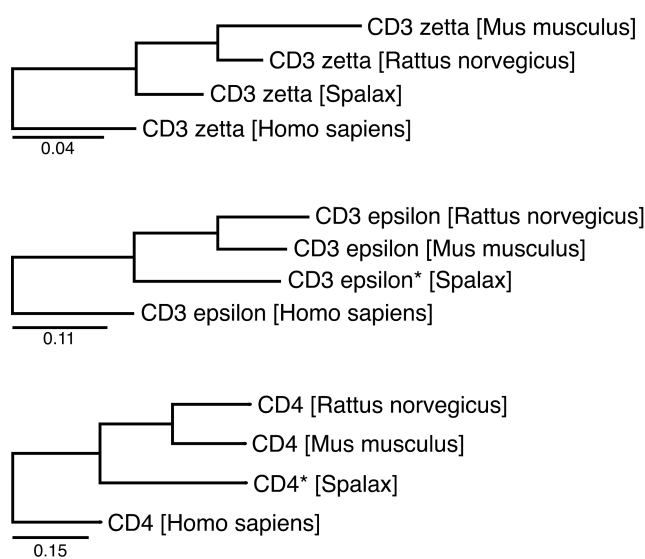


Рисунок 22. Филогенетические деревья аминокислотных последовательностей генов двух субъединиц CD3 (ϵ и ζ) и CD4. Деревья построены при помощи программного обеспечения COBALT [150].

Антитела были использованы для окрашивания с последующей флуоресцентной сортировкой (FACS). Для эксперимента были выделены лимфоциты из лимфоузлов и селезенки молодого слепыша. Большинство антител не дали позитивного сигнала при сортировке.

Антитела, которые дали положительный сигнал (анти-CD3, CD4 и CD44), были использованы для последующей клеточной сортировки. Из отсортированных клеток была выделена тотальная РНК, приготовлены и отсековены библиотеки кДНК транскриптома.

Анализ полученных транскриптомов сортированных клеток показал отсутствие взаимосвязи между специфичностью антитела, используемого при сортировке, и паттерном экспрессии основных маркеров. (Рис. 23) В частности клетки, сортированные при помощи антитела к CD3, экспрессировали В-клеточные маркеры *Cd19* и *Ms4A1(Cd20)*, что говорит об отсутствии обогащения при применении антител.

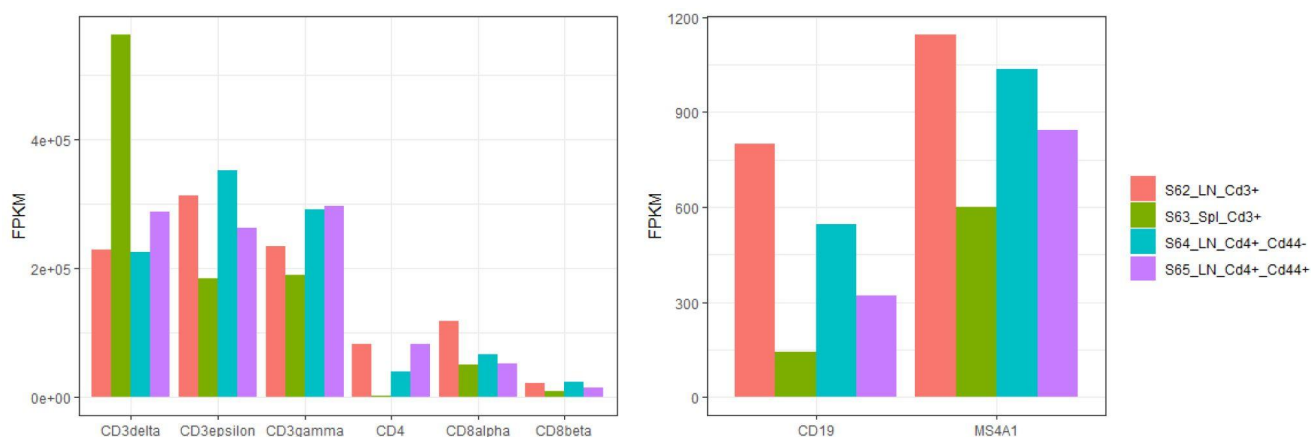


Рисунок 23. Экспрессия Т и В-клеточных маркеров в образцах клеток слепыша, отсортированных с использованием тестовых антител на популяции CD3+ (красный - клетки лимфоузла и зеленый-клетки селезенки), CD4+ (бирюзовый) и CD4+CD44+(фиолетовый). Значение экспрессии указано в FPKM - число прочтений на число килобаз экзонов на миллион выровненных прочтений (англ. fragments per kilobase of exon per million mapped fragments, FPKM).

Таким образом, нам не удалось найти коммерчески доступных антител, специфично связывающихся с конкретным поверхностным маркером. Учитывая высокую консервативность последовательности генов, возможная причина - посттрансляционная модификация белков, в частности гликозилирование, которое, как было показано, активно происходит в клетках слепыша [151].

5.10. Низкий уровень дифференцировки Т-лимфоцитов у 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 (Рис. 24), что предполагает сравнимое количество Т-лимфоцитов в селезенке. В старости, как у мыши, так и у слепыша, экспрессия обоих генов снижалась, что свидетельствует о снижении количества Т-лимфоцитов в селезенке в старости, как это уже было ранее показано для мышей [152]. Различие в экспрессии этих генов наблюдалось между группами новорожденных животных, по-видимому из-за продолжительного периода постнатального развития у слепыша. Экспрессия гена *Trbc1* во всех возрастных группах слепыша, в отличие от мыши, оставалась на низком уровне (Рис. 24).

Далее мы проанализировали экспрессию ключевых транскрипционных факторов и контрольных точек, отвечающих за дифференциацию Т-клеточных популяций. (Рис. 25) Так как количество Т-клеток с возрастом снижается, мы нормировали данные на экспрессии Т-клеточных специфичных генов - *Cd3d*, *Cd3e* и *Trbc*. Как уже было сказано в первой части данной работы, экспрессия таких транскрипционных факторов как *Eomes*, *Gata3*, *Tbx21* и *Foxp3*, свидетельствует о наличии функциональных популяций эффекторных Т-лимфоцитов и Т-клеток памяти, а снижение их экспрессии было ассоциировано с уменьшением численности функциональных популяций [54].

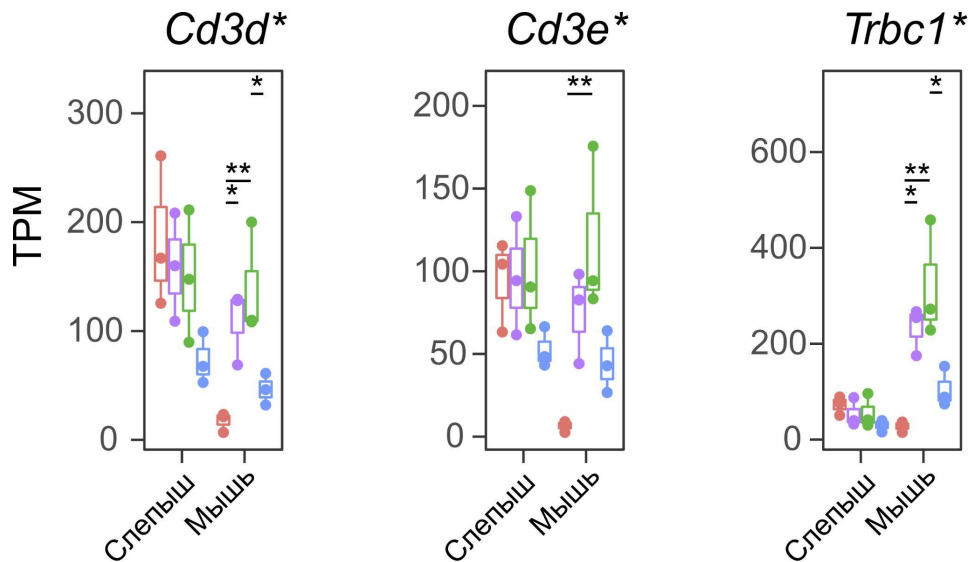


Рисунок 24. Экспрессия основных Т-клеточных генов-маркеров. Ящики показывают медиану, края отображают 25-й и 75-й процентиля, а усы определяют значения, удаляющиеся не больше чем на 1.5 интерквантильных размаха от границ ящика. Цвета обозначают возрастную группу: красный - новорожденные, фиолетовый - 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. TPМ - число транскриптов на миллион прочтений.

Экспрессия всех указанных генов, отвечающих за дифференцировку Т-клеток, была низкой во всех возрастных группах слепыша. Экспрессия *Eomes*, регулятора дифференциации CD8⁺ клеток памяти, росла с возрастом у мышей, что соответствует ранее опубликованным данным для человека [153], и не менялась у слепыша. Транскрипционные факторы *Tbx21*, *Gata3* и *Rorc*, отвечающие за дифференцировку Th1, Th2 и Th17 эффекторных CD4⁺ клеток, также показали рост экспрессии с возрастом у мышей, в то время как у слепыша их экспрессия оставалась низкой. Надо отметить, что экспрессия *Gata3* и *Tbx21* у слепыша слегка росла с возрастом, хоть и оставалась на значительно более низком уровне, чем у мышей. У новорожденных мышей мы обнаружили высокую экспрессию *Rorc*, что можно объяснить его участием в процессах формирования зародышевой лимфоидной ткани [154]. Экспрессия *Foxp3*, транскрипционного фактора специфичного для Treg, оставалась на высокой во всех возрастных группах у

мышь, что сходится с опубликованными данными [152], [155], и стабильно низкой у слепыша.

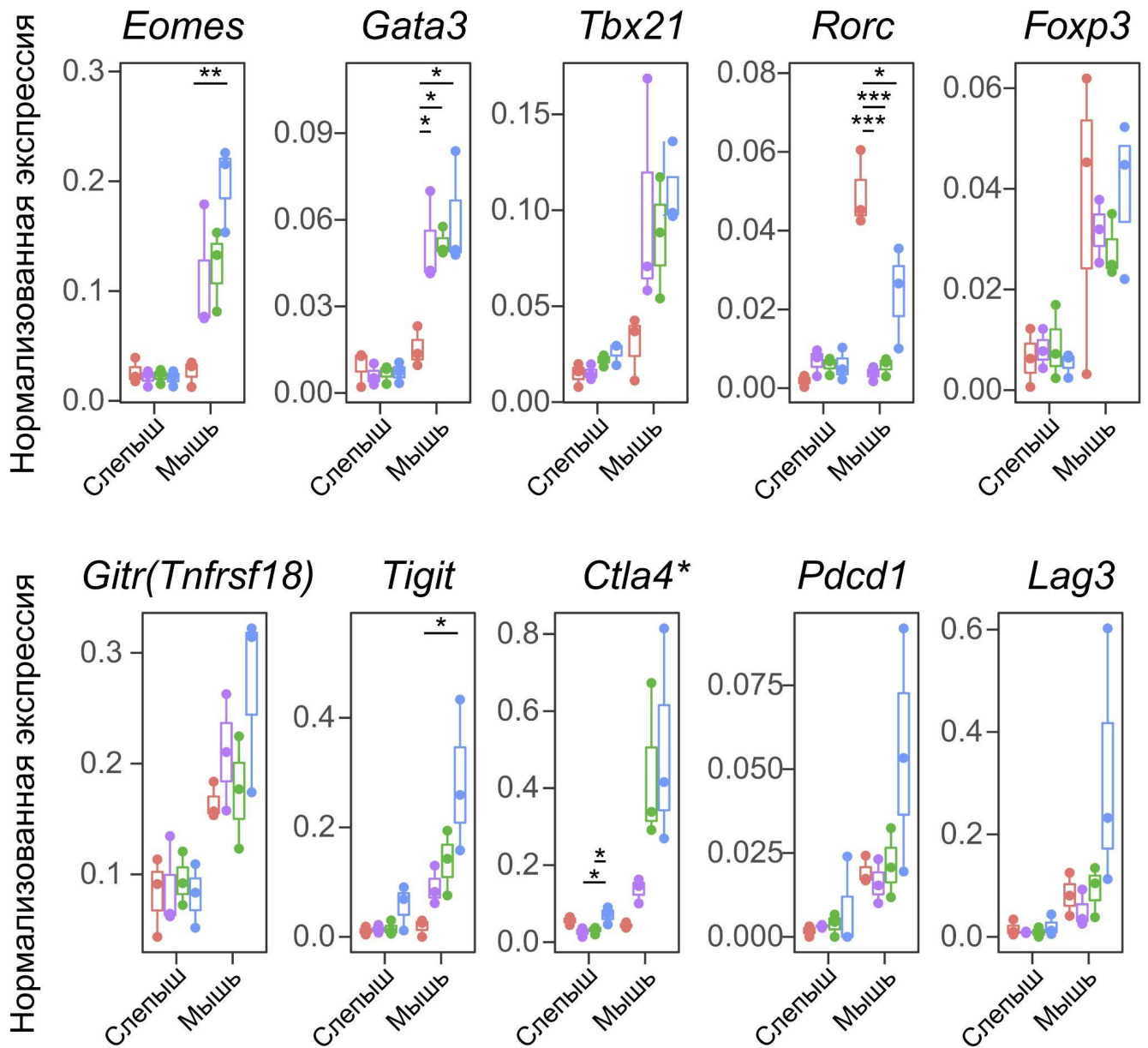


Рисунок 25. Экспрессия транскрипционных факторов Т-клеток, молекул контрольных точек и генов, экспрессия которых характерна для наивных Т-клеток. Цвета обозначают возрастную группу: красный - новорожденные, фиолетовый - молодые, зеленый - взрослые, синий - старые. P-value посчитан односторонним ANOVA 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.

Другие гены, отвечающие за дифференциацию Т-лимфоцитов, *Gitr* (*Tnfrsf18*), *Tigit*, *Pd1* (*Pdcd1*), *Lag3*, *Ctla4*, показали рост экспрессии с возрастом у мышей, что также соотносится с ранее опубликованными данными [152], [156]. Такой же тренд был показан для *Tigit*, *Ctla4* and *Lag3* у людей [153], [157]. У слепыша все гены не изменили уровень экспрессии с возрастом (Рис. 25).

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

5.11. Экспрессия цитокинов и цитокиновых рецепторов

IL-2 является одним из основных факторов функциональной Т-клеточной активности, он экспрессируется активированными клетками и необходим для клеточной пролиферации, созревания Treg клеток в тимусе [158] и развития CD8+ Т-клеток памяти [159]. У мышей *Il2* экспрессируется на низком уровне, в то время как у слепыша его экспрессия была едва детектируемой (Рис. 26). У молодых и взрослых мышей экспрессия субъединиц рецептора к IL-2 (*Il2rb*, *Il2rg*) была выше, чем у новорожденных особей (Рис. 27). У слепыша наблюдался неизменный с возрастом низкий уровень экспрессии этого рецептора. Такой же паттерн экспрессии мы обнаружили и для рецептора *Il21r* (Рис. 27), который участвует в сигналинге пролиферации и дифференциации Т-, В- и NK-клеток [160], [161]. Схожим был паттерн экспрессии рецептора *Il15ra*, участвующего в пролиферации CD8+ Т-клеток памяти [162]. *Il16*, способствующий Th1 дифференциации [163], также экспрессировался у слепыша на неизменно низком уровне. Повышенная экспрессия *Il10* у слепыша по сравнению с мышью может свидетельствовать об ингибировании Th1 дифференциации [164], [165]. Кроме того, у слепыша, в отличие от мыши, не наблюдался рост экспрессии генов, ассоциированных с цитотоксическими свойствами Т- и NK- клетками - *Prf1*, *Ifng*, *Gzma*, *Fasl* и *Il2a*.

Рецептор IL-4RA, отвечает за Th2 дифференциацию, а также участвует в иммунном ответе второго типа на уровне В-клеток, макрофагов и эозинофилов [166]. У мышей экспрессия *Il4ra* и *Il5ra* (Рис. 27), участвующего в активации эозинофилов и базофилов, росла с возрастом и оставалась низкой у слепыша во всех возрастных группах. Напротив, экспрессия *Il13ra1*, также вовлеченного в 2 тип иммунного ответа на уровне макрофагов и эндотелиальных клеток, была у слепыша на более высоком уровне, чем у мышей.

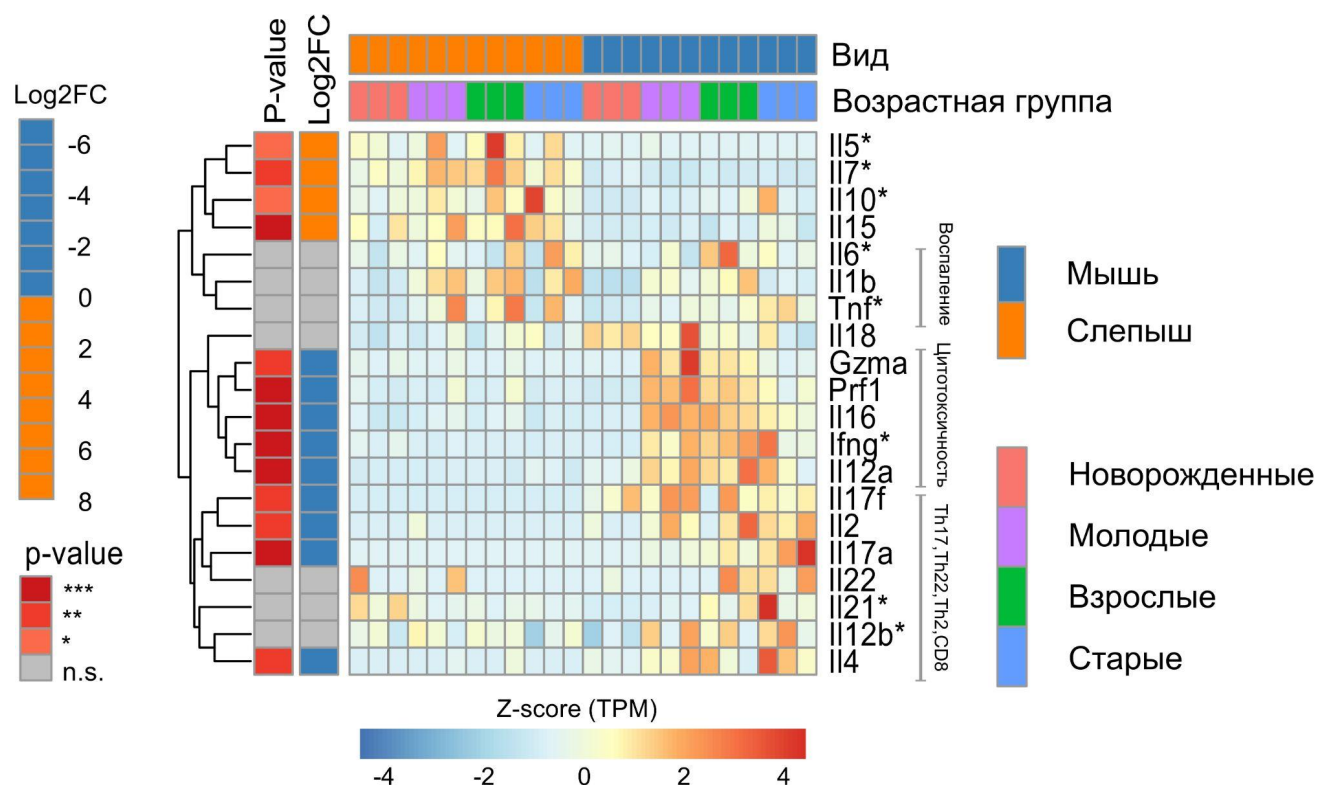


Рисунок 26. Тепловая карта экспрессии базовых цитокинов. Карта построена на основе данных транскриптома слепышей и мышей разных возрастных групп (по 3 особи в каждой группе). Цвет ячеек карты отражает Z-оценку значений экспрессии в TPM (количество стандартных отклонений от среднего значения экспрессии 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'.

Интересно, что пониженная экспрессия рецепторов к IL-5, IL-10 и IL-15 у слепыша скомпенсирована повышенной экспрессией генов самих цитокинов, что, вероятно, говорит об альтернативных механизмах регуляции (Рис 26).

В соответствии с низкой экспрессией *Rorc*, транскрипционного фактора TH17 клеток, экспрессия генов *Il17* (*Il17a*, *Il17f*) и гена соответствующего рецептора (*Il17ra*) не менялась возрастом у слепыша.

Все вышеперечисленные наблюдения подтверждают теорию о том, что для иммунной системы слепыша, скорее всего, не характерно формирование долгоживущих клональных популяций дифференцированных Т-лимфоцитов, в том числе цитотоксических Т-клеток.

В то же время, экспрессия *Il7*, участвующего в поддержании Т-клеточного гомеостаза и способствующего пролиферации наивных Т-клеток без дифференциации в клетки памяти [167], [168], была выше у слепыша, чем у мыши. Более того, нормализованная экспрессия рецептора *Il7r* у спалакса значительно росла с возрастом. Для людей ранее было показано снижение экспрессии *Il7r* в периферической крови, а высокий уровень экспрессии рецептора был ассоциирован с пониженным уровнем смертности [153], [157], [169]. Кроме того, нормализованная экспрессия генов, характерных для наивных Т-лимфоцитов (*Ccr7* и *Left*), снижалась с возрастом у мышей и росла у слепыша (Рис. 28). Эти данные указывают на гомеостаз популяции наивных Т-клеток с возрастом у слепыша.

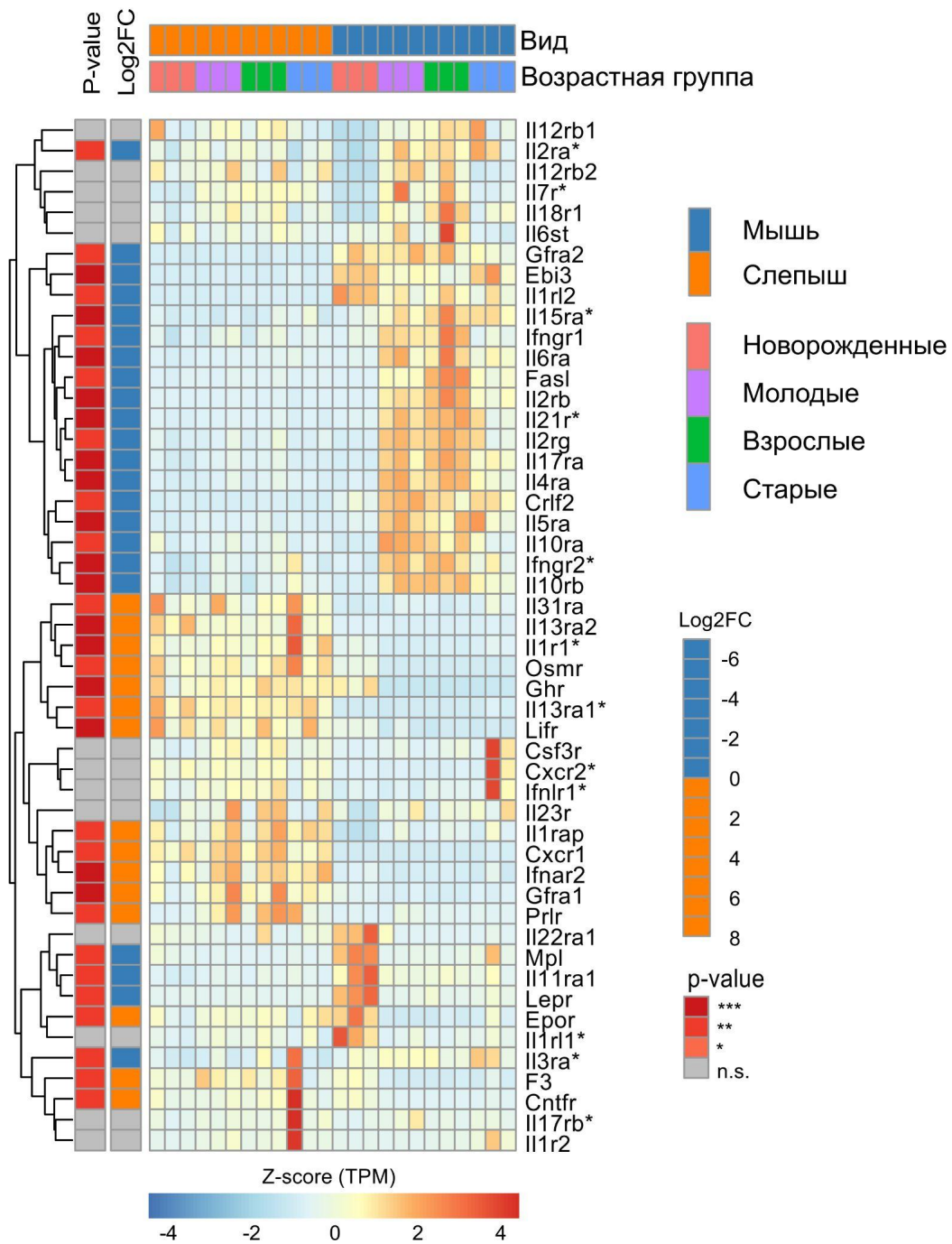


Рисунок 27. Тепловая карта экспрессии иммунных рецепторов. Карта построена на основе данных транскриптома слепышей и мышей разных возрастных групп (по 3 особи в каждой группе). Цвет ячеек карты отражает Z-оценку значений экспрессии в TPM (количество стандартных отклонений от среднего значения экспрессии 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’.

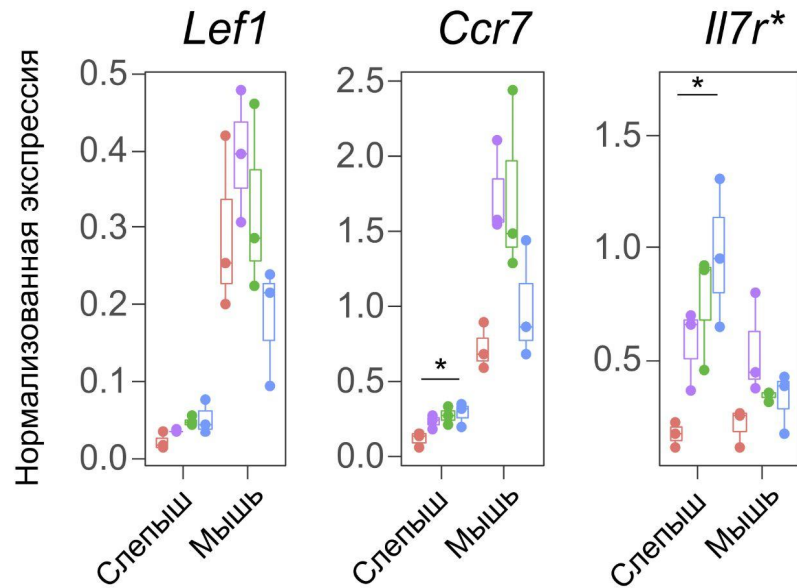


Рисунок 28. Экспрессия генов *Lef1*, *Ccr7* и *Il7r**. Исходно подсчитанный уровень экспрессии в TPM нормализован на среднее значение суммы экспрессий генов *Cd3d*, *Cd3e* и *Trbc1*, выраженных в TPM. Цвета обозначают возрастную группу: красный - новорожденные, фиолетовый - молодые, зеленый - взрослые, 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’.

Эти данные, вместе с данными о константном разнообразии и инволюции тимуса, свидетельствуют о пролонгированном гомеостазе наивных Т- клеток у слепыша.

5.12. Репертуар иммуноглобулинов

Сравнительный анализ репертуара иммуноглобулинов мыши и слепыша выявил значительные различия. Согласно ранее опубликованным данным, IgM появляется в начале развития мышей и людей и до самой старости является доминирующим изотипом [170]–[172].

В наших данных репертуаров мышей мы также увидели преобладание IgM начиная с рождения, затем частота постепенно уменьшается, уступая IgG и IgA в старом возрасте (Рис. 29). 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 двух лет.

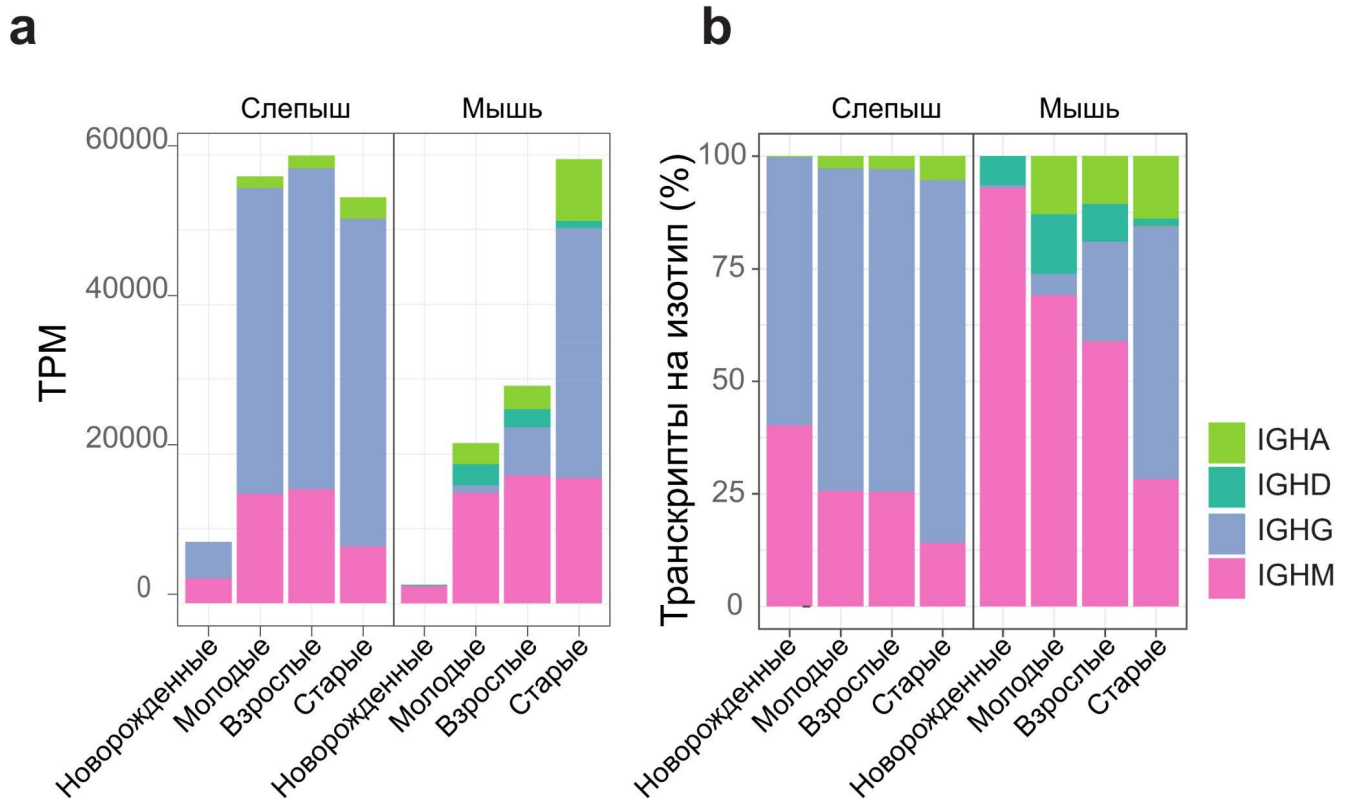


Рисунок 29. Уровень экспрессии и доля изотипов иммуноглобулинов на основе анализа данных транскриптома. TPM - число транскриптов на миллион п.о. Каждая возрастная группа представлена 3 особями.

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 (Рис. 30). Такая же тенденция была ранее описана для человека [173]–[175]. Анализ SHM в репертуарах слепышей показал, что частота гипермутаций с возрастом у этих животных остается постоянной и даже немного снижается.

Разнообразие репертуара иммуноглобулинов IgA и IgG у мышей растет с возрастом, а для IgM начинает снижаться во взрослом возрасте к старости. (Рис. 31) 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 [176], количество которых с возрастом падает [177], [178], 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.

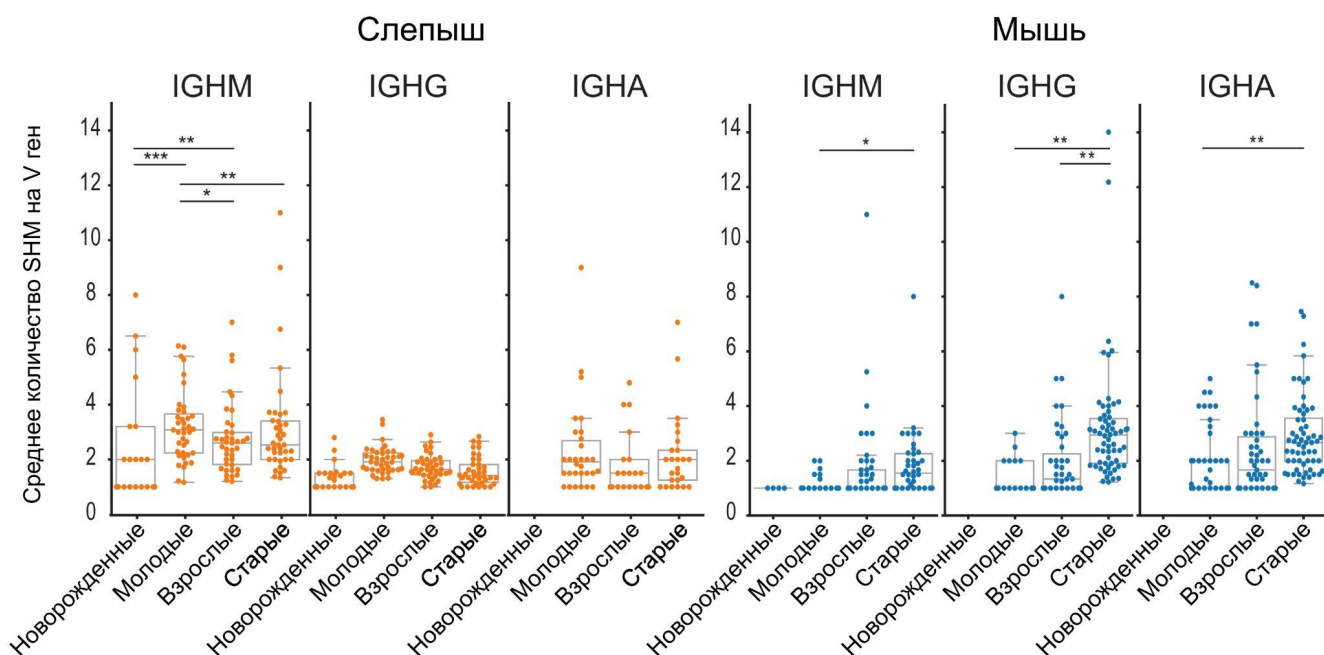


Рисунок 30. Среднее количество SHM на IGHV ген. Графики построены на основе данных секвенирования репертуара иммуноглобулинов. P-value посчитан односторонним ANOVA с тестом Тьюки. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. Ящики показывают медиану, края отображают 25-й и 75-й процентиля, а усы определяют значения удаляющиеся не больше чем на 1.5 интерквантильных размаха от границ ящика. Каждая возрастная группа представлена 3 особями.

Затем мы провели анализ свойств аминокислот, входящих в состав CDR3. (Рис. 32) Мы обнаружили увеличение средней длины CDR3 с возрастом в репертуаре IgM у мышей. Это может быть следствием снижения доли В1 клеток, так как ранее было показано, что CDR3 В1 клеток короче и менее гидрофобны [179].

У слепыша длина CDR3 в репертуарах IgM возрастала с возрастом менее резко, чем у мышей, что может говорить о не таком значительном снижении числа В1 клеток. Доля сильно взаимодействующих аминокислот (гидрофобных и ароматических) в CDR3 репертуаров IgM, метрика, отражающая средний уровень теоретической силы связывания и кросс-реактивности [180]–[182], была значительно ниже у слепыша по сравнению с мышью и постепенно снижалась с возрастом. Это также может быть следствием более стабильной популяции В1 клеток у слепыша. Кроме того, в пользу этого утверждения говорит повышенная экспрессия *Pl10*, продукция которого, как было отмечено в обзоре литературы,

увеличивается в ответ на активацию Т-клеток В1 антигенпрезентирующими клетками.

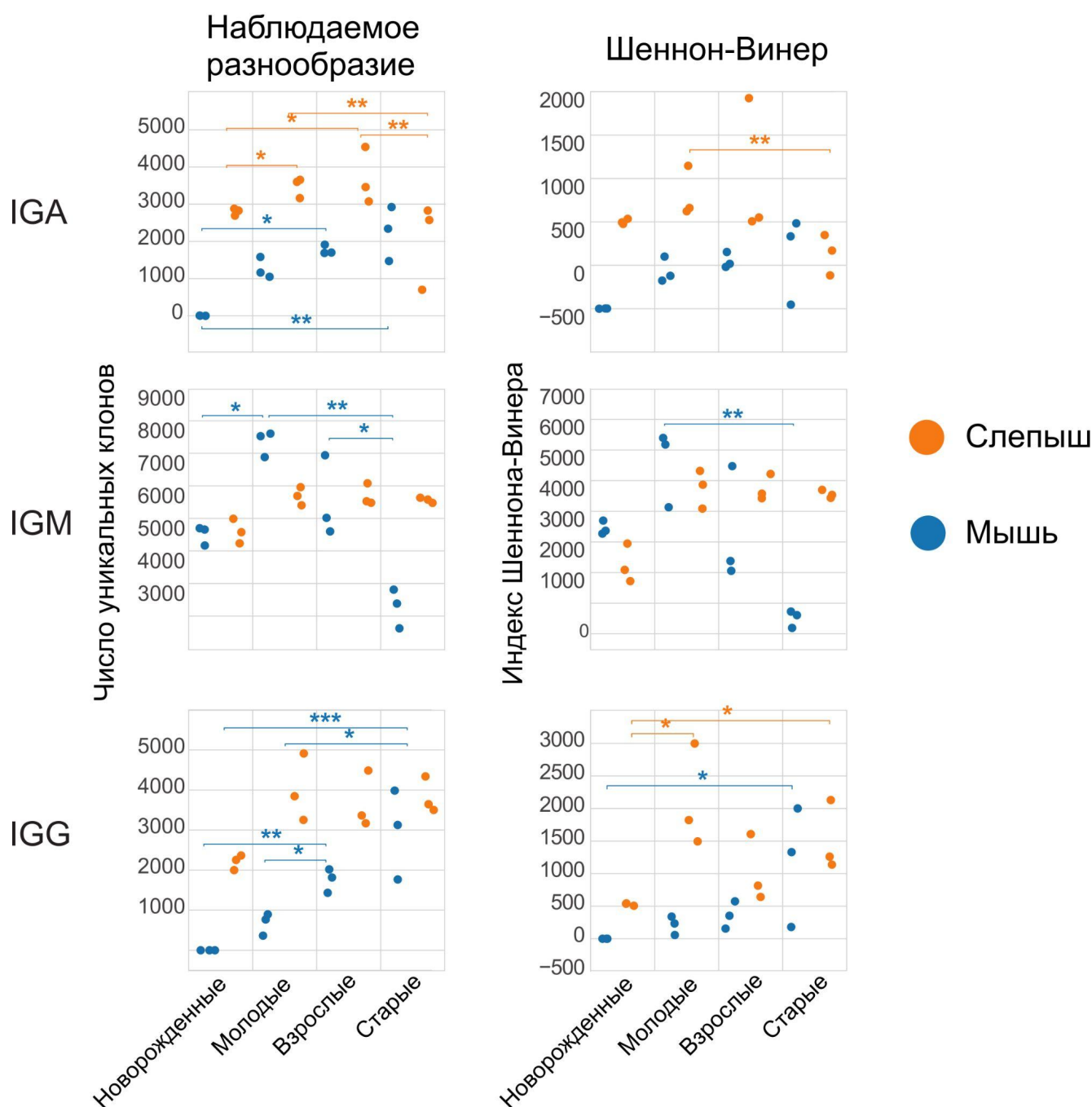


Рисунок 31. Клональность (индекс Шеннона-Винера) и разнообразие репертуара иммуноглобулинов. Каждый образец был нормирован на 10000 UMI. P-value посчитан односторонним ANOVA с тестом Тьюки. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

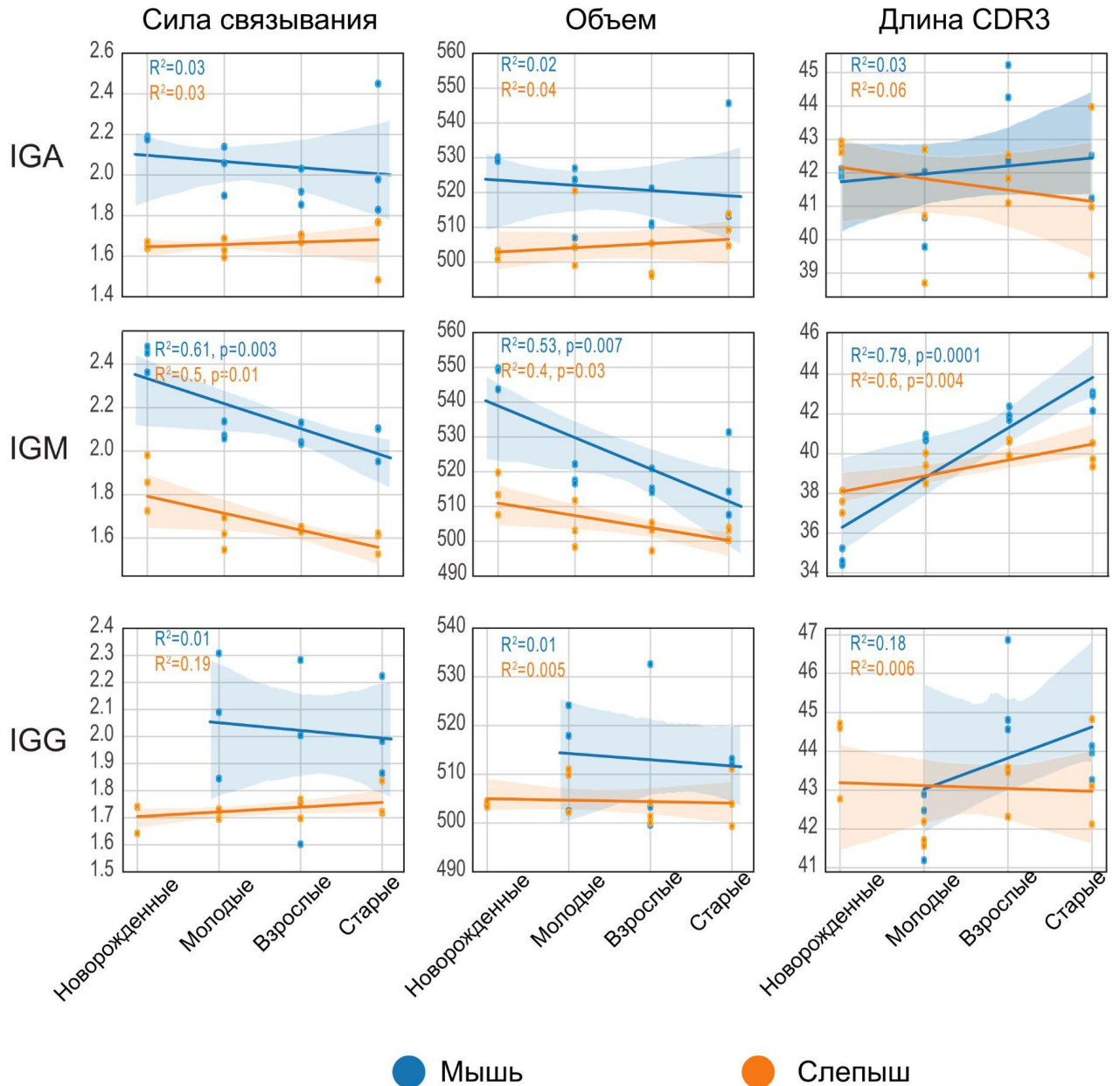


Рисунок 32. Средние значения характеристик репертуара CDR3 IGH. Сила связывания определяется долей ароматических и гидрофобных аминокислот. Сила связывания и объем рассчитаны для 5 центральных аминокислот в CDR3. Полупрозрачные области показывают 95% доверительный интервал. Двусторонний P-value рассчитан, используя тест Вальда с t-распределением. R²-коэффициент детерминации Пирсона. Каждая возрастная группа представлена 3 особями.

6. 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 T-клонотипов в репертуаре слепыша указывает на наличие ранее неописанных инвариантных популяций T-клеток.

7. Заключение

Результаты данной работы говорят о том, что традиционное понимание адаптивного иммунитета не представляет возможным описать устройство иммунитета некоторых долгоживущих видов. Мы показали отсутствие накопления Т-клеточных клональных экспансий с возрастом, замедленный рост экспрессии генов, ассоциированных с дифференцировкой Т-лимфоцитов, отсутствие накопления гипермутаций и, косвенно, более стабильную популяцию клеток В1, ответственных в частности за продукцию IgM антител, у слепыша. Все вышеперечисленные результаты предполагают более развитый кратковременный иммунный ответ при отсутствии выраженной долговременной иммунной памяти.

Отсутствие долговременной памяти может снижать накопление аутоиммунных и других “ошибочно отвечающих” Т- и В-лимфоцитов, а также снижать вероятность патологических воспалительных процессов.

При этом мы показали наличие у старых особей слепыша разнообразной и функционально активной популяции наивных Т-лимфоцитов, что дает больше свободы для формирования иммунного ответа.

С другой стороны, такая способность поддерживать гомеостаз иммунной системы с возрастом, скорее всего, обретается за счет более энергозатратного и долго формирующегося иммунного ответа на патогены, с которыми организм уже встречался, но не сформировал памяти. Однако, вероятно, в условиях подземного существования слепыши сталкиваются с низкой вирусной нагрузкой, и такой подход для них более выгоден.

Мы показали, что у слепыша с возрастом не повышается экспрессия FoxP3 и CTLA4, что скорее всего свидетельствует об отсутствии накопления Treg клеток, которые в норме накапливаются у мышей и помогают контролировать аутоиммунные эффекторные Т-клетки [183], [184].

Мы показали наличие у слепыша инволюции тимуса, которая при этом не влияет на стабильность разнообразия Т-клеточного репертуара с возрастом, что предполагает наличие активной периферической пролиферации наивных

Т-клеток. Это предположение также подкрепляется постоянно повышенным уровнем экспрессии *Il7* и соответствующего рецептора.

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. Особое внимание стоит уделить использованию метода транскриптома единичных клеток для анализа отдельных популяций лимфоцитов.

8. Список сокращений

- APC – антигенпрезентирующая клетка (англ. antigen-presenting cell)
- АТФ - аденозинтрифосфат
- АМФ - аденозинмонофосфат
- BCR - В-клеточный рецептор (англ. B-cell receptor)
- CDR – регион, определяющий комплементарность (англ. complementarity determining region)
- СМ - Т-клетки центральной памяти (англ. central memory)
- DP - двойные позитивные тимоциты
- DN - двойные негативные тимоциты
- ЕМ – Т-клетки эффекторной памяти (англ. effector memory)
- FACS – флуоресцентно активированная сортировка клеток (англ. fluorescence-activated cell sorting)
- FPKM - число прочтений на число килобаз экзонов на миллион выровненных прочтений (англ. fragments per kilobase of exon per million mapped fragments, FPKM)
- ICOS - индуцируемый Т-клеточный костимулятор (англ. *inducible co-stimulator*)
- ITAM - иммуно-рецепторный мотив активации на основе тирозина
- МНС -главный комплекс гистосовместимости(англ. major histocompatibility complex)
- RACE – метод синтеза кДНК на базе РНК (англ. rapid amplification of cDNA ends)
- RAG1 и RAG2 – гены, запускающие рекомбинацию (англ. recombination activating genes)
- RSSs – сигнальные последовательности рекомбинации (англ. recombination signal sequences)
- TCR – Т-клеточный рецептор (англ. T-cell receptor)
- TCR- α - альфа цепь Т-клеточного рецептора
- ТКР- β - бета цепь Т-клеточного рецептора

TdT – терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (англ. terminal deoxynucleotidyl transferase)

TPM - число транскриптов на миллион выровненных прочтений (англ. Transcripts Per Million, TPM)

TRAC – константный сегмент гена α цепи Т-клеточного рецептора

TRAJ – соединительный сегмент гена α цепи Т-клеточного рецептора

TRAV – переменный сегмент гена α цепи Т-клеточного рецептора

TRBC – константный сегмент гена β цепи Т-клеточного рецептора

TRBJ – соединительный сегмент гена β цепи Т-клеточного рецептора

TRBV – переменный сегмент гена β цепи Т-клеточного рецептора

Temra - эффекторные Т-клетки памяти, экспрессирующие CD45RA (англ. effector memory cells re-expressing CD45RA)

Treg - регуляторные Т-клетки

Tvm – Т-клетки виртуальной памяти (англ. virtual memory)

T_{rm} - тканеспецифичные Т-клетки (resident memory T-cell, T_{rm})

T_{cm} - Т-клетки центральной памяти (англ. central memory)

T_{fh} - фолликулярные Т-хелперы (англ. T follicular helper cells)

UCB – пуповинная кровь (англ. umbilical cord blood)

UDG – Урацил-ДНК-гликозилаза

UMI – уникальный молекулярный идентификатор, молекулярный баркод (англ. unique molecular identifier)

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – комплементарная ДНК

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

9. Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации

1. **Izraelson M**, Metsger M, Davydov AN, Shagina IA, Dronina MA, Obraztsova 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

10. Список литературы

- [1] I. Manov et al., “Pronounced cancer resistance in a subterranean rodent, the blind mole-rat, *Spalax*: in vivo and in vitro evidence,” *BMC Biol.*, vol. 11, p. 91, Aug. 2013.
- [2] Q. Qi et al., “Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 36, pp. 13139–13144, Sep. 2014.
- [3] V. I. Zarnitsyna, B. D. Evavold, L. N. Schoettle, J. N. Blattman, and R. Antia, “Estimating the diversity, completeness, and cross-reactivity of the T cell repertoire,” *Front. Immunol.*, vol. 4, p. 485, Dec. 2013.
- [4] A. M. W. Thierry Mora, “Quantifying lymphocyte receptor diversity,” in *Systems Immunology*, C. J. Jayajit Das, Ed. CRC Press, 2019, pp. 183–198.
- [5] E. S. Egorov et al., “The changing landscape of naive T cell receptor repertoire with human aging,” *Front. Immunol.*, vol. 9, Jul. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01618.
- [6] V. Giudicelli, D. Chaume, and M.-P. Lefranc, “IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. Database issue, pp. D256–61, Jan. 2005.
- [7] K. E. Gregoire, I. Goldschneider, R. W. Barton, and F. J. Bollum, “Ontogeny of terminal deoxynucleotidyl transferase-positive cells in lymphohemopoietic tissues of rat and mouse,” *J. Immunol.*, vol. 123, no. 3, pp. 1347–1352, Sep. 1979.
- [8] M. V. Pogorelyy et al., “Method for identification of condition-associated public antigen receptor sequences,” *Elife*, vol. 7, Mar. 2018, doi: 10.7554/eLife.33050.
- [9] H. W. Schroeder Jr, F. Mortari, S. Shiokawa, P. M. Kirkham, R. A. Elgavish, and F. E. Bertrand 3rd, “Developmental regulation of the human antibody repertoire,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 764, pp. 242–260, Sep. 1995.
- [10] M. Merckenschlager, D. Graf, M. Lovatt, U. Bommhardt, R. Zamoyska, and A. G. Fisher, “How many thymocytes audition for selection?,” *J. Exp. Med.*, vol. 186, no. 7, pp. 1149–1158, Oct. 1997.

- [11] A.-M. K. Wegener, X. Hou, J. Dietrich, and C. Geisler, “Distinct Domains of the CD3- γ Chain Are Involved in Surface Expression and Function of the T Cell Antigen Receptor (*),” *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 9, pp. 4675–4680, Mar. 1995.
- [12] W. Lee and G. R. Lee, “Transcriptional regulation and development of regulatory T cells,” *Exp. Mol. Med.*, vol. 50, no. 3, pp. e456–e456, Mar. 2018.
- [13] D. L. Owen et al., “Thymic regulatory T cells arise via two distinct developmental programs,” *Nat. Immunol.*, vol. 20, no. 2, pp. 195–205, Feb. 2019.
- [14] J. J. Sussman et al., “Failure to synthesize the T Cell CD3- ζ chain: Structure and function of a partial T cell receptor complex,” *Cell*, vol. 52, no. 1, pp. 85–95, Jan. 1988.
- [15] H. Clevers, B. Alarcon, T. Wileman, and C. Terhorst, “The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 6, pp. 629–662, 1988.
- [16] B. J. Schmiedel et al., “Single-cell eQTL analysis of activated T cell subsets reveals activation and cell type-dependent effects of disease-risk variants,” *Sci Immunol*, vol. 7, no. 68, p. eabm2508, Feb. 2022.
- [17] I. V. Lyadova and A. V. Panteleev, “Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2015, p. 854507, Nov. 2015.
- [18] T. R. Mosmann and R. L. Coffman, “TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 7, pp. 145–173, 1989.
- [19] K. M. Smith et al., “Th1 and Th2 CD4⁺ T cells provide help for B cell clonal expansion and antibody synthesis in a similar manner in vivo,” *J. Immunol.*, vol. 165, no. 6, pp. 3136–3144, Sep. 2000.
- [20] A. Schmidt, N. Oberle, and P. H. Krammer, “Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression,” *Front. Immunol.*, vol. 3, p. 51, Mar. 2012.
- [21] S. A. Kasatskaya et al., “Functionally specialized human CD4 T-cell subsets express physicochemically distinct TCRs,” *Elife*, vol. 9, Dec. 2020, doi: 10.7554/eLife.57063.

[22] A. N. Hegazy et al., “Interferons Direct Th2 Cell Reprogramming to Generate a Stable GATA-3 T-bet Cell Subset with Combined Th2 and Th1 Cell Functions,” *Immunity*, vol. 32, no. 1, pp. 116–128, 2010. doi: 10.1016/j.immuni.2009.12.004.

[23] M. Panzer, S. Sitte, S. Wirth, I. Drexler, T. Sparwasser, and D. Voehringer, “Rapid in vivo conversion of effector T cells into Th2 cells during helminth infection,” *J. Immunol.*, vol. 188, no. 2, pp. 615–623, Jan. 2012.

[24] Xuyu Zhou, Samantha Bailey-Bucktrout, Lukas Tjeker, Jeffrey A Bluestone, “Plasticity of CD4⁺ FoxP3⁺ T cells,” *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 21, no. 3, pp. 281–285, Jun. 2009.

[25] C. F. Krebs and O. M. Steinmetz, “CD4 T Cell Fate in Glomerulonephritis: A Tale of Th1, Th17, and Novel Treg Subtypes,” *Mediators Inflamm.*, vol. 2016, p. 5393894, Nov. 2016.

[26] S. A. McClymont et al., “Plasticity of human regulatory T cells in healthy subjects and patients with type 1 diabetes,” *J. Immunol.*, vol. 186, no. 7, pp. 3918–3926, Apr. 2011.

[27] K. M. Haas, J. C. Poe, D. A. Steeber, and T. F. Tedder, “B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*,” *Immunity*, vol. 23, no. 1, pp. 7–18, Jul. 2005.

[28] J. B. Wong et al., “B-1a cells acquire their unique characteristics by bypassing the pre-BCR selection stage,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, p. 4768, Oct. 2019.

[29] N. E. Holodick, N. Rodríguez-Zhurbenko, and A. M. Hernández, “Defining natural antibodies,” *Front. Immunol.*, vol. 8, p. 872, Jul. 2017.

[30] N. Baumgarth, O. C. Herman, G. C. Jager, L. E. Brown, L. A. Herzenberg, and J. Chen, “B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection,” *J. Exp. Med.*, vol. 192, no. 2, pp. 271–280, Jul. 2000.

[31] M. Rauch, R. Tussiwand, N. Bosco, and A. G. Rolink, “Crucial role for BAFF-BAFF-R signaling in the survival and maintenance of mature B cells,” *PLoS One*, vol. 4, no. 5, p. e5456, May 2009.

[32] M. Zouali and Y. Richard, “Marginal zone B-cells, a gatekeeper of innate immunity,” *Front. Immunol.*, vol. 2, p. 63, Dec. 2011.

[33] K. Attanavanich and J. F. Kearney, “Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells,” *J. Immunol.*, vol. 172, no. 2, pp. 803–811, Jan. 2004.

[34] K. R. Qazi, U. Gehrman, E. Domange Jordö, M. C. I. Karlsson, and S. Gabrielsson, “Antigen-loaded exosomes alone induce Th1-type memory through a B-cell-dependent mechanism,” *Blood*, vol. 113, no. 12, pp. 2673–2683, Mar. 2009.

[35] T.-T. Zhang et al., “Germinal center B cell development has distinctly regulated stages completed by disengagement from T cell help,” *Elife*, vol. 6, May 2017, doi: 10.7554/eLife.19552.

[36] E. C. Rosser and C. Mauri, “Regulatory B cells: origin, phenotype, and function,” *Immunity*, vol. 42, no. 4, pp. 607–612, Apr. 2015.

[37] C. I. Daien et al., “Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity,” *Arthritis Rheumatol*, vol. 66, no. 8, pp. 2037–2046, Aug. 2014.

[38] C. Hua et al., “A proliferation inducing ligand (APRIL) promotes IL-10 production and regulatory functions of human B cells,” *J. Autoimmun.*, vol. 73, pp. 64–72, Sep. 2016.

[39] S. Xiao, C. R. Brooks, R. A. Sobel, and V. K. Kuchroo, “Tim-1 is essential for induction and maintenance of IL-10 in regulatory B cells and their regulation of tissue inflammation,” *J. Immunol.*, vol. 194, no. 4, pp. 1602–1608, Feb. 2015.

[40] S. K. Lundy and D. L. Boros, “Fas ligand-expressing B-1a lymphocytes mediate CD4(+)-T-cell apoptosis during schistosomal infection: induction by interleukin 4 (IL-4) and IL-10,” *Infect. Immun.*, vol. 70, no. 2, pp. 812–819, Feb. 2002.

[41] E. R. Zacca et al., “PD-L1 Regulatory B Cells Are Significantly Decreased in Rheumatoid Arthritis Patients and Increase After Successful Treatment,” *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 2241, Oct. 2018.

[42] H. Kaku, K. F. Cheng, Y. Al-Abed, and T. L. Rothstein, “A novel mechanism of B cell-mediated immune suppression through CD73 expression and adenosine production,” *J. Immunol.*, vol. 193, no. 12, pp. 5904–5913, Dec. 2014.

[43] M. Mittelbrunn and G. Kroemer, “Hallmarks of T cell aging,” *Nat. Immunol.*, vol. 22, no. 6, pp. 687–698, Jun. 2021.

[44] G. Gossel, T. Hogan, D. Cownden, B. Seddon, and A. J. Yates, “Memory CD4 T cell subsets are kinetically heterogeneous and replenished from naive T cells at high levels,” *Elife*, vol. 6, Mar. 2017, doi: 10.7554/eLife.23013.

[45] C. Kim et al., “Activation of miR-21-Regulated Pathways in Immune Aging Selects against Signatures Characteristic of Memory T Cells,” *Cell Rep.*, vol. 25, no. 8, pp. 2148–2162.e5, Nov. 2018.

[46] B. Hu et al., “Transcription factor networks in aged naïve CD4 T cells bias lineage differentiation,” *Aging Cell*, vol. 18, no. 4, p. e12957, Aug. 2019.

[47] L. Arthur et al., “Cellular and plasma proteomic determinants of COVID-19 and non-COVID-19 pulmonary diseases relative to healthy aging,” *Nature Aging*, vol. 1, no. 6, pp. 535–549, 2021. doi: 10.1038/s43587-021-00067-x.

[48] D. A. Mogilenko et al., “Comprehensive Profiling of an Aging Immune System Reveals Clonal GZMK CD8 T Cells as Conserved Hallmark of Inflammaging,” *Immunity*, vol. 54, no. 1, pp. 99–115.e12, Jan. 2021.

[49] Y. Shimada, M. Hayashi, Y. Nagasaka, Y. Ohno-Iwashita, and M. Inomata, “Age-associated up-regulation of a negative co-stimulatory receptor PD-1 in mouse CD4 T cells,” *Experimental Gerontology*, vol. 44, no. 8, pp. 517–522, 2009. doi: 10.1016/j.exger.2009.05.003.

[50] G.-M. Han, B. Zhao, S. Jeyaseelan, and J.-M. Feng, “Age-associated parallel increase of Foxp3(+)CD4(+) regulatory and CD44(+)CD4(+) memory T cells in SJL/J mice,” *Cell. Immunol.*, vol. 258, no. 2, pp. 188–196, May 2009.

[51] C. S. Lages et al., “Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation,” *J. Immunol.*, vol. 181, no. 3, pp. 1835–1848, Aug. 2008.

[52] T. Nishioka, J. Shimizu, R. Iida, S. Yamazaki, and S. Sakaguchi, “CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T Cells and CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ T Cells in Aged Mice,” *The Journal of Immunology*, vol. 176, no. 11, pp. 6586–6593, 2006. doi: 10.4049/jimmunol.176.11.6586.

[53] X. Guo et al., “Publisher Correction: Global characterization of T cells in non-small-cell lung cancer by single-cell sequencing,” *Nat. Med.*, vol. 24, no. 10, p. 1628, Oct. 2018.

[54] Y. Elyahu et al., “Aging promotes reorganization of the CD4⁺ T cell landscape toward extreme regulatory and effector phenotypes,” *Sci Adv*, vol. 5, no. 8, p. eaaw8330, Aug. 2019.

[55] M. Izraelson et al., “Comparative analysis of murine T-cell receptor repertoires,” *Immunology*, vol. 153, no. 2, pp. 133–144, Feb. 2018.

[56] O. V. Britanova et al., “Dynamics of Individual T Cell Repertoires: From Cord Blood to Centenarians,” *J. Immunol.*, vol. 196, no. 12, pp. 5005–5013, Jun. 2016.

[57] K. Hashimoto et al., “Single-cell transcriptomics reveals expansion of cytotoxic CD4⁺ T cells in supercentenarians,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 116, no. 48, pp. 24242–24251, 2019. doi: 10.1073/pnas.1907883116.

[58] R. Cibotti et al., “Public and private V beta T cell receptor repertoires against hen egg white lysozyme (HEL) in nontransgenic versus HEL transgenic mice,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 180, no. 3, pp. 861–872, 1994. doi: 10.1084/jem.180.3.861.

[59] V. P. Arguet et al., “Dominant selection of an invariant T cell antigen receptor in response to persistent infection by Epstein-Barr virus,” *J. Exp. Med.*, vol. 180, no. 6, pp. 2335–2340, Dec. 1994.

[60] A. Lim et al., “Frequent Contribution of T Cell Clonotypes with Public TCR Features to the Chronic Response Against a Dominant EBV-Derived Epitope: Application to Direct Detection of Their Molecular Imprint on the Human Peripheral T

Cell Repertoire,” *The Journal of Immunology*, vol. 165, no. 4. pp. 2001–2011, 2000. doi: 10.4049/jimmunol.165.4.2001.

[61] S. Candéias, C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis, “The V beta 17 T cell repertoire: skewed J beta usage after thymic selection; dissimilar CDR3s in CD4 versus CD8 cells,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 174, no. 5. pp. 989–1000, 1991. doi: 10.1084/jem.174.5.989.

[62] E. Roldan, A. Sottini, A. Bettinardi, A. Albertini, L. Imberti, and D. Primi, “Different TCRBV genes generate biased patterns of V-D-J diversity in human T cells,” *Immunogenetics*, vol. 41, no. 2–3. 1995. doi: 10.1007/bf00182318.

[63] D. A. Price et al., “Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8+ T cell populations specific for persistent DNA viruses,” *J. Exp. Med.*, vol. 202, no. 10, pp. 1349–1361, Nov. 2005.

[64] V. Venturi, D. A. Price, D. C. Douek, and M. P. Davenport, “The molecular basis for public T-cell responses?,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 3. pp. 231–238, 2008. doi: 10.1038/nri2260.

[65] O. V. Britanova et al., “Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling,” *J. Immunol.*, vol. 192, no. 6, pp. 2689–2698, Mar. 2014.

[66] J. P. Miller and D. Allman, “The decline in B lymphopoiesis in aged mice reflects loss of very early B-lineage precursors,” *J. Immunol.*, vol. 171, no. 5, pp. 2326–2330, Sep. 2003.

[67] G. H. Kline, T. A. Hayden, and N. R. Klinman, “B cell maintenance in aged mice reflects both increased B cell longevity and decreased B cell generation,” *J. Immunol.*, vol. 162, no. 6, pp. 3342–3349, Mar. 1999.

[68] J. P. Miller and M. P. Cancro, “B cells and aging: balancing the homeostatic equation,” *Exp. Gerontol.*, vol. 42, no. 5, pp. 396–399, May 2007.

[69] I. Cortegano et al., “Altered marginal zone and innate-like B cells in aged senescence-accelerated SAMP8 mice with defective IgG1 responses,” *Cell Death Dis.*, vol. 8, no. 8, p. e3000, Aug. 2017.

[70] D. Frasca et al., “Aging down-regulates the transcription factor E2A, activation-induced cytidine deaminase, and Ig class switch in human B cells,” *J. Immunol.*, vol. 180, no. 8, pp. 5283–5290, Apr. 2008.

[71] S. Han et al., “Enhanced differentiation of splenic plasma cells but diminished long-lived high-affinity bone marrow plasma cells in aged mice,” *J. Immunol.*, vol. 170, no. 3, pp. 1267–1273, Feb. 2003.

[72] H. W. Lim, P. Hillsamer, A. H. Banham, and C. H. Kim, “Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 7, pp. 4180–4183, Oct. 2005.

[73] S. Sharma, A. L. Dominguez, and J. Lustgarten, “High accumulation of T regulatory cells prevents the activation of immune responses in aged animals,” *J. Immunol.*, vol. 177, no. 12, pp. 8348–8355, Dec. 2006.

[74] E. Speziali, A. F. Santiago, R. M. Fernandes, N. M. Vaz, J. S. Menezes, and A. M. C. Faria, “Specific immune responses but not basal functions of B and T cells are impaired in aged mice,” *Cell. Immunol.*, vol. 256, no. 1–2, pp. 1–5, Feb. 2009.

[75] M. Ratliff, S. Alter, D. Frasca, B. B. Blomberg, and R. L. Riley, “In senescence, age-associated B cells secrete TNF α and inhibit survival of B-cell precursors,” *Aging Cell*, vol. 12, no. 2, pp. 303–311, Apr. 2013.

[76] Y. Hao, P. O’Neill, M. S. Naradikian, J. L. Scholz, and M. P. Cancro, “A B-cell subset uniquely responsive to innate stimuli accumulates in aged mice,” *Blood*, vol. 118, no. 5, pp. 1294–1304, Aug. 2011.

[77] A. V. Rubtsov et al., “Toll-like receptor 7 (TLR7)-driven accumulation of a novel CD11c⁺ B-cell population is important for the development of autoimmunity,” *Blood*, vol. 118, no. 5, pp. 1305–1315, Aug. 2011.

[78] L. M. Russell Knode et al., “Age-Associated B Cells Express a Diverse Repertoire of V and V κ Genes with Somatic Hypermutation,” *J. Immunol.*, vol. 198, no. 5, pp. 1921–1927, Mar. 2017.

[79] S. L. Peng, S. J. Szabo, and L. H. Glimcher, “T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 8, pp. 5545–5550, Apr. 2002.

[80] A. H. Ellebedy et al., “Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in human blood after viral infection or vaccination,” *Nat. Immunol.*, vol. 17, no. 10, pp. 1226–1234, Oct. 2016.

[81] A. V. Rubtsov, K. Rubtsova, J. W. Kappler, J. Jacobelli, R. S. Friedman, and P. Marrack, “CD11c-Expressing B Cells Are Located at the T Cell/B Cell Border in Spleen and Are Potent APCs,” *J. Immunol.*, vol. 195, no. 1, pp. 71–79, Jul. 2015.

[82] S. Bratsch, N. Wertz, K. Chaloner, T. H. Kunz, and J. E. Butler, “The little brown bat, *M. lucifugus*, displays a highly diverse V H, D H and J H repertoire but little evidence of somatic hypermutation,” *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 35, no. 4, pp. 421–430, Apr. 2011.

[83] J. M. Martínez Gómez et al., “Phenotypic and functional characterization of the major lymphocyte populations in the fruit-eating bat *Pteropus alecto*,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 37796, Nov. 2016.

[84] J. W. Wynne et al., “Characterization of the Antigen Processing Machinery and Endogenous Peptide Presentation of a Bat MHC Class I Molecule,” *J. Immunol.*, vol. 196, no. 11, pp. 4468–4476, Jun. 2016.

[85] Z. Qu et al., “Structure and Peptidome of the Bat MHC Class I Molecule Reveal a Novel Mechanism Leading to High-Affinity Peptide Binding,” *J. Immunol.*, vol. 202, no. 12, pp. 3493–3506, Jun. 2019.

[86] F. Buonocore and M. Gerdol, “Alternative adaptive immunity strategies: coelacanth, cod and shark immunity,” *Mol. Immunol.*, vol. 69, pp. 157–169, Jan. 2016.

[87] J. P. de Magalhães, J. A. S. Cabral, and D. Magalhães, “The influence of genes on the aging process of mice: a statistical assessment of the genetics of aging,” *Genetics*, vol. 169, no. 1, pp. 265–274, Jan. 2005.

[88] A. Turturro, W. W. Witt, S. Lewis, B. S. Hass, R. D. Lipman, and R. W. Hart, “Growth curves and survival characteristics of the animals used in the Biomarkers of Aging Program,” *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 54, no. 11, pp. B492–501, Nov. 1999.

- [89] R. Buffenstein, “The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research,” *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, vol. 60, no. 11, pp. 1369–1377, Nov. 2005.
- [90] A. Seluanov, V. N. Gladyshev, J. Vijg, and V. Gorbunova, “Mechanisms of cancer resistance in long-lived mammals,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 18, no. 7, pp. 433–441, Jul. 2018.
- [91] S. Ma and V. N. Gladyshev, “Molecular signatures of longevity: Insights from cross-species comparative studies,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 70, pp. 190–203, Oct. 2017.
- [92] H. G. Hilton et al., “Single-cell transcriptomics of the naked mole-rat reveals unexpected features of mammalian immunity,” *PLoS Biol.*, vol. 17, no. 11, p. e3000528, Nov. 2019.
- [93] J. Artwohl, S. Ball-Kell, T. Valyi-Nagy, S. P. Wilson, Y. Lu, and T. J. Park, “Extreme susceptibility of African naked mole rats (*Heterocephalus glaber*) to experimental infection with herpes simplex virus type 1,” *Comp. Med.*, vol. 59, no. 1, pp. 83–90, Feb. 2009.
- [94] S. Emmrich et al., “Ectopic cervical thymic and no thymic involution until midlife in naked mole rats,” *Aging Cell*, vol. 20, no. 10, p. e13477, Oct. 2021.
- [95] J. Mestas and C. C. W. Hughes, “Of mice and not men: differences between mouse and human immunology,” *J. Immunol.*, vol. 172, no. 5, pp. 2731–2738, Mar. 2004.
- [96] A. Odeh, M. Dronina, V. Domankevich, I. Shams, and I. Manov, “Downregulation of the inflammatory network in senescent fibroblasts and aging tissues of the long-lived and cancer-resistant subterranean wild rodent, *Spalax*,” *Aging Cell*, vol. 19, no. 1, p. e13045, Jan. 2020.
- [97] V. Domankevich et al., “Adaptive patterns in the p53 protein sequence of the hypoxia- and cancer-tolerant blind mole rat *Spalax*,” *BMC Evol. Biol.*, vol. 16, p. 177, Sep. 2016.
- [98] J. C. Gomez-Verjan and N. A. Rivero-Segura, *Clinical Genetics and Genomics of Aging*. Springer Nature, 2020.

[99] X. Fang et al., “Genome-wide adaptive complexes to underground stresses in blind mole rats *Spalax*,” *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 3966, Jun. 2014.

[100] M. Shugay et al., “Towards error-free profiling of immune repertoires,” *Nat. Methods*, vol. 11, no. 6, pp. 653–655, Jun. 2014.

[101] D. A. Bolotin et al., “Antigen receptor repertoire profiling from RNA-seq data,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 35, no. 10, pp. 908–911, Oct. 2017.

[102] J. B. Hughes, J. J. Hellmann, T. H. Ricketts, and B. J. Bohannan, “Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 67, no. 10, pp. 4399–4406, Oct. 2001.

[103] C.-H. Chiu and A. Chao, “Estimating and comparing microbial diversity in the presence of sequencing errors,” *PeerJ*, vol. 4, p. e1634, Feb. 2016.

[104] M. Shugay, D. A. Bolotin, E. V. Putintseva, M. V. Pogorelyy, I. Z. Mamedov, and D. M. Chudakov, “Huge Overlap of Individual TCR Beta Repertoires,” *Front. Immunol.*, vol. 4, p. 466, Dec. 2013.

[105] J. Mamrot et al., “De novo transcriptome assembly for the spiny mouse (*Acomys cahirinus*),” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 8996, Aug. 2017.

[106] A. M. Bolger, M. Lohse, and B. Usadel, “Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data,” *Bioinformatics*, vol. 30, no. 15, pp. 2114–2120, Aug. 2014.

[107] E. Bushmanova, D. Antipov, A. Lapidus, and A. D. Prjibelski, “rnaSPAdes: a de novo transcriptome assembler and its application to RNA-Seq data,” *Gigascience*, vol. 8, no. 9, Sep. 2019, doi: 10.1093/gigascience/giz100.

[108] M. G. Grabherr et al., “Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 29, no. 7, pp. 644–652, May 2011.

[109] S. Kannan, J. Hui, K. Mazooji, L. Pachter, and D. Tse, “Shannon: An Information-Optimal de Novo RNA-Seq Assembler,” *bioRxiv*, p. 039230, Feb. 09, 2016. doi: 10.1101/039230.

[110] D. G. Gilbert, “Genes of the pig, , reconstructed with EvidentialGene,” *PeerJ*, vol. 7, p. e6374, Feb. 2019.

[111] F. A. Simão, R. M. Waterhouse, P. Ioannidis, E. V. Kriventseva, and E. M. Zdobnov, “BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs,” *Bioinformatics*, vol. 31, no. 19, pp. 3210–3212, Oct. 2015.

[112] C. Camacho et al., “BLAST+: architecture and applications,” *BMC Bioinformatics*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, Dec. 2009.

[113] R. D. Finn et al., “Pfam: the protein families database,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. Database issue, pp. D222–30, Jan. 2014.

[114] H. Nielsen, “Predicting Secretory Proteins with SignalP,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 1611, pp. 59–73, 2017.

[115] A. Krogh, B. Larsson, G. von Heijne, and E. L. Sonnhammer, “Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes,” *J. Mol. Biol.*, vol. 305, no. 3, pp. 567–580, Jan. 2001.

[116] B. Langmead and S. L. Salzberg, “Fast gapped-read alignment with Bowtie 2,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 4, pp. 357–359, Mar. 2012.

[117] B. Li and C. N. Dewey, “RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome,” *BMC Bioinformatics*, vol. 12, no. 1, pp. 1–16, Aug. 2011.

[118] “S.galili_v1.0 - Genome - Assembly - NCBI.” https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000622305.1/ (accessed Sep. 07, 2022).

[119] S. Durinck, P. T. Spellman, E. Birney, and W. Huber, “Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt,” *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 8, pp. 1184–1191, Jul. 2009.

[120] D. J. Laydon, C. R. M. Bangham, and B. Asquith, “Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach,” *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, vol. 370, no. 1675, Aug. 2015, doi: 10.1098/rstb.2014.0291.

[121] I. Kinde, J. Wu, N. Papadopoulos, K. W. Kinzler, and B. Vogelstein, “Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 23, pp. 9530–9535, Jun. 2011.

[122] T. Kivioja et al., “Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 1, pp. 72–74, Nov. 2011.

[123] J. A. Casbon, R. J. Osborne, S. Brenner, and C. P. Lichtenstein, “A method for counting PCR template molecules with application to next-generation sequencing,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 39, no. 12, p. e81, Jul. 2011.

[124] C. E. Shannon, *A mathematical theory of communication*. 1948.

[125] E. H. Simpson, “Measurement of Diversity,” *Nature*, p. 163, 1949.

[126] B. Efron and R. Thisted, *Estimating the Number of Unseen Species: (how Many Words Did Shakespeare Know?)*. 1975.

[127] R. K. Colwell et al., “Models and estimators linking individual-based and sample-based rarefaction, extrapolation and comparison of assemblages,” *J. plant ecol.*, vol. 5, no. 1, pp. 3–21, Mar. 2012.

[128] E. S. Egorov et al., “Quantitative profiling of immune repertoires for minor lymphocyte counts using unique molecular identifiers,” *J. Immunol.*, vol. 194, no. 12, pp. 6155–6163, Jun. 2015.

[129] M. A. Turchaninova et al., “High-quality full-length immunoglobulin profiling with unique molecular barcoding,” *Nat. Protoc.*, vol. 11, no. 9, pp. 1599–1616, Sep. 2016.

[130] J. Weber et al., “PiggyBac transposon tools for recessive screening identify B-cell lymphoma drivers in mice,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, p. 1415, Mar. 2019.

[131] A. Malik et al., “Genome maintenance and bioenergetics of the long-lived hypoxia-tolerant and cancer-resistant blind mole rat, *Spalax*: a cross-species analysis of brain transcriptome,” *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 38624, Dec. 2016.

[132] M. Matz et al., “Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 27, no. 6, pp. 1558–1560, Mar. 1999.

[133] H. Li and R. Durbin, “Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform,” *Bioinformatics*, vol. 26, no. 5, pp. 589–595, Mar. 2010.

[134] Y. Yu et al., “A rat RNA-Seq transcriptomic BodyMap across 11 organs and 4 developmental stages,” *Nat. Commun.*, vol. 5, p. 3230, 2014.

[135] S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, and K. Tamura, “MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 35, no. 6, pp. 1547–1549, Jun. 2018.

[136] S. Das, M. Hirano, C. McCallister, R. Tako, and N. Nikolaidis, “Comparative genomics and evolution of immunoglobulin-encoding loci in tetrapods,” *Adv. Immunol.*, vol. 111, pp. 143–178, 2011.

[137] D. K. Lanning, P. J. Esteves, and K. L. Knight, “The remnant of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) IgD gene,” *PLoS One*, vol. 12, no. 8, p. e0182029, Aug. 2017.

[138] D. Franckaert et al., “Premature thymic involution is independent of structural plasticity of the thymic stroma,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 45, no. 5, pp. 1535–1547, May 2015.

[139] D. Nizetić, F. Figueroa, H. J. Müller, B. Arden, E. Nevo, and J. Klein, “Major histocompatibility complex of the mole-rat. I. Serological and biochemical analysis,” *Immunogenetics*, vol. 20, no. 4, pp. 443–451, 1984.

[140] C. Krishna, D. Chowell, M. Gönen, Y. Elhanati, and T. A. Chan, “Genetic and environmental determinants of human TCR repertoire diversity,” *Immun. Ageing*, vol. 17, p. 26, Sep. 2020.

[141] I. V. Zvyagin et al., “Distinctive properties of identical twins’ TCR repertoires revealed by high-throughput sequencing,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 16, pp. 5980–5985, Apr. 2014.

[142] L. C. Garner, P. Klenerman, and N. M. Provine, “Insights Into Mucosal-Associated Invariant T Cell Biology From Studies of Invariant Natural Killer T Cells,” *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 1478, Jun. 2018.

[143] L. J. Howson et al., “MAIT cell clonal expansion and TCR repertoire shaping in human volunteers challenged with *Salmonella Paratyphi A*,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, p. 253, Jan. 2018.

[144] R. Reantragoon et al., “Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells,” *J. Exp. Med.*, vol. 210, no. 11, pp. 2305–2320, Oct. 2013.

[145] A. Madi et al., “T cell receptor repertoires of mice and humans are clustered in similarity networks around conserved public CDR3 sequences,” *Elife*, vol. 6, Jul. 2017, doi: 10.7554/eLife.22057.

[146] M. Shugay et al., “VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. D1, pp. D419–D427, Jan. 2018.

[147] R. Bedel et al., “Effective functional maturation of invariant natural killer T cells is constrained by negative selection and T-cell antigen receptor affinity,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 1, pp. E119–28, Jan. 2014.

[148] H.-F. Koay et al., “Diverse MR1-restricted T cells in mice and humans,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, p. 2243, May 2019.

[149] W. S. DeWitt 3rd, A. Smith, G. Schoch, J. A. Hansen, F. A. Matsen 4th, and P. Bradley, “Human T cell receptor occurrence patterns encode immune history, genetic background, and receptor specificity,” *Elife*, vol. 7, Aug. 2018, doi: 10.7554/eLife.38358.

[150] J. S. Papadopoulos and R. Agarwala, “COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences,” *Bioinformatics*, vol. 23, no. 9, pp. 1073–1079, May 2007.

[151] D. Miskevich, A. Chaban, M. Dronina, I. Abramovich, E. Gottlieb, and I. Shams, “Comprehensive Analysis of C Glucose Fate in the Hypoxia-Tolerant Blind Mole Rat Skin Fibroblasts,” *Metabolites*, vol. 11, no. 11, Oct. 2021, doi: 10.3390/metabo11110734.

[152] D. K. J. Pieren, N. A. M. Smits, M. D. B. van de Garde, and T. Guichelaar, “Response kinetics reveal novel features of ageing in murine T cells,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, p. 5587, Apr. 2019.

[153] M. J. Peters et al., “The transcriptional landscape of age in human peripheral blood,” *Nat. Commun.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–14, Oct. 2015.

[154] G. Eberl, S. Marmon, M.-J. Sunshine, P. D. Rennert, Y. Choi, and D. R. Littman, “An essential function for the nuclear receptor RORgamma(t) in the generation

of fetal lymphoid tissue inducer cells,” *Nat. Immunol.*, vol. 5, no. 1, pp. 64–73, Jan. 2004.

[155] S. K. Garg et al., “Aging is associated with increased regulatory T-cell function,” *Aging Cell*, vol. 13, no. 3, pp. 441–448, Jun. 2014.

[156] R. Channappanavar, B. S. Twardy, P. Krishna, and S. Suvas, “Advancing age leads to predominance of inhibitory receptor expressing CD4 T cells,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 130, no. 10, pp. 709–712, Oct. 2009.

[157] E. J. Márquez et al., “Sexual-dimorphism in human immune system aging,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 751, Feb. 2020.

[158] M. A. Burchill, J. Yang, C. Vogtenhuber, B. R. Blazar, and M. A. Farrar, “IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells,” *J. Immunol.*, vol. 178, no. 1, pp. 280–290, Jan. 2007.

[159] M. A. Williams, A. J. Tyznik, and M. J. Bevan, “Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells,” *Nature*, vol. 441, no. 7095, pp. 890–893, Jun. 2006.

[160] W. J. Leonard and C.-K. Wan, “IL-21 Signaling in Immunity,” *F1000Res.*, vol. 5, Feb. 2016, doi: 10.12688/f1000research.7634.1.

[161] K. Skak, K. S. Frederiksen, and D. Lundsgaard, “Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression,” *Immunology*, vol. 123, no. 4, pp. 575–583, Apr. 2008.

[162] C. D. Surh and J. Sprent, “Homeostasis of naive and memory T cells,” *Immunity*, vol. 29, no. 6, pp. 848–862, Dec. 2008.

[163] E. A. Lynch, C. A. W. Heijens, N. F. Horst, D. M. Center, and W. W. Cruikshank, “Cutting edge: IL-16/CD4 preferentially induces Th1 cell migration: requirement of CCR5,” *J. Immunol.*, vol. 171, no. 10, pp. 4965–4968, Nov. 2003.

[164] D. S. Skundric, J. Cai, W. W. Cruikshank, and D. Gveric, “Production of IL-16 correlates with CD4⁺ Th1 inflammation and phosphorylation of axonal cytoskeleton in multiple sclerosis lesions,” *J. Neuroinflammation*, vol. 3, p. 13, May 2006.

[165] D. F. Fiorentino, M. W. Bond, and T. R. Mosmann, “Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones,” *J. Exp. Med.*, vol. 170, no. 6, pp. 2081–2095, Dec. 1989.

[166] D. Bagnasco, M. Ferrando, G. Varricchi, G. Passalacqua, and G. W. Canonica, “A Critical Evaluation of Anti-IL-13 and Anti-IL-4 Strategies in Severe Asthma,” *Int. Arch. Allergy Immunol.*, vol. 170, no. 2, pp. 122–131, Aug. 2016.

[167] M. V. Soares, N. J. Borthwick, M. K. Maini, G. Janossy, M. Salmon, and A. N. Akbar, “IL-7-dependent extrathymic expansion of CD45RA⁺ T cells enables preservation of a naive repertoire,” *J. Immunol.*, vol. 161, no. 11, pp. 5909–5917, Dec. 1998.

[168] V. Nguyen, A. Mendelsohn, and J. W. Larrick, “Interleukin-7 and Immunosenescence,” *J Immunol Res*, vol. 2017, p. 4807853, Apr. 2017.

[169] W. M. Passtoors et al., “IL7R gene expression network associates with human healthy ageing,” *Immun. Ageing*, vol. 12, p. 21, Nov. 2015.

[170] F. Horns et al., “Lineage tracing of human B cells reveals the in vivo landscape of human antibody class switching,” Aug. 2016, doi: 10.7554/eLife.16578.

[171] M. T. Ventura, M. Casciaro, S. Gangemi, and R. Buquicchio, “Immunosenescence in aging: between immune cells depletion and cytokines up-regulation,” *Clin. Mol. Allergy*, vol. 15, p. 21, Dec. 2017.

[172] R. Paganelli et al., “Changes in circulating B cells and immunoglobulin classes and subclasses in a healthy aged population,” *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 90, no. 2, pp. 351–354, Nov. 1992.

[173] T. Rogosch et al., “IgA response in preterm neonates shows little evidence of antigen-driven selection,” *J. Immunol.*, vol. 189, no. 11, pp. 5449–5456, Dec. 2012.

[174] B. G. de Jong et al., “Human IgG2- and IgG4-expressing memory B cells display enhanced molecular and phenotypic signs of maturity and accumulate with age,” *Immunol. Cell Biol.*, vol. 95, no. 9, pp. 744–752, Oct. 2017.

[175] M. Ghraichy et al., “Maturation of the Human Immunoglobulin Heavy Chain Repertoire With Age,” *Front. Immunol.*, vol. 11, p. 1734, Aug. 2020.

[176] Y. S. Choi, J. A. Dieter, K. Rothausler, Z. Luo, and N. Baumgarth, “B-1 cells in the bone marrow are a significant source of natural IgM,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 42, no. 1, pp. 120–129, Jan. 2012.

[177] N. Baumgarth, “A Hard(y) Look at B-1 Cell Development and Function,” *J. Immunol.*, vol. 199, no. 10, pp. 3387–3394, Nov. 2017.

[178] N. E. Holodick and T. L. Rothstein, “B cells in the aging immune system: time to consider B-1 cells,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1362, pp. 176–187, Dec. 2015.

[179] T. A. Prohaska et al., “Massively Parallel Sequencing of Peritoneal and Splenic B Cell Repertoires Highlights Unique Properties of B-1 Cell Antibodies,” *J. Immunol.*, vol. 200, no. 5, pp. 1702–1717, Mar. 2018.

[180] A. Kosmrlj, A. K. Jha, E. S. Huseby, M. Kardar, and A. K. Chakraborty, “How the thymus designs antigen-specific and self-tolerant T cell receptor sequences,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 43, pp. 16671–16676, Oct. 2008.

[181] A. Kosmrlj et al., “Effects of thymic selection of the T-cell repertoire on HLA class I-associated control of HIV infection,” *Nature*, vol. 465, no. 7296, pp. 350–354, May 2010.

[182] B. D. Stadinski et al., “Hydrophobic CDR3 residues promote the development of self-reactive T cells,” *Nat. Immunol.*, vol. 17, no. 8, pp. 946–955, Aug. 2016.

[183] K. Klocke, S. Sakaguchi, R. Holmdahl, and K. Wing, “Induction of autoimmune disease by deletion of CTLA-4 in mice in adulthood,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 17, pp. E2383–92, Apr. 2016.

[184] L. S. K. Walker, “EFIS Lecture: Understanding the CTLA-4 checkpoint in the maintenance of immune homeostasis,” *Immunol. Lett.*, vol. 184, pp. 43–50, Apr. 2017.

11. Приложение

Таблица 1 Список праймеров для построения кДНК библиотек TCR и иммуноглобулинов Spalax galili и Mus Musculus

Название	Последовательность
Синтез первой цепи кДНК TCR	
SmartNNNa	AAGCAGUGGTAUCAACGCAGAGUNNNNNUNNNNNUNNNNUCT T(rG) ₄
Mus_alpha_synt3	AGTCAAAGTCGGTGAAC
Mus_beta_synt2	ATCTCTGCTTTTGATG
SpX_alpha_synt	GACTTCATGTCCAGCACAGT
SpX_beta_synt	ATTTCTGCTTCTGAGG
Первый раунд амплификации кДНК библиотек TCR	
Smart20	CACTCTATCCGACAAGCAGTGGTATCAACGCAG-3'
Step1	CACTCTATCCGACAAGCAGT-3'
Mus_alpha_rev2	GCTGTCCTGAGACCGAGGAT
Mus_BC4	ATGGCTCAAACAAGGAGACC
SpX_TCR_alpha	TGAAGTCGGTGAATAGGCAGA
SpX_TCR_beta	GCTTCTGAGGGCTCAAACAC
Второй раунд амплификации кДНК библиотек TCR	
M1s_i	(N) ₂₋₄ (XXXXX)CAGTGGTATCAACGCAGAG
Mus_acj_i	(N) ₂₋₄ (XXXXX)CAGGTTCTGGGTTCTGGATGT

Mus_bcj_i	(N) ₂₋₄ (XXXXX)AGTCACATTTCTCAGATCCT
Spx_acj_i	(N) ₂₋₄ (XXXXX)ATTAGCTGGTACACGGCAGG
Spx_bcj_i	(N) ₂₋₄ (XXXXX)AACACAGTGACCTCAGGTGG
Синтез первой цепи кДНК иммуноглобулинов	
SmartNNNa	AAGCAGUGGTAUCAACGCAGAGUNNNNUNNNNUNNNN UCTT(rG) ₄
Spx_IgA_synt	TCAGCTGGCTGCTCATGGTG
Spx_IgM_synt	AGGCGGCCATGTACTTG
Spx_IgG_synt	CTGAGCTGSTGAGGGTG
Первый раунд амплификации кДНК библиотек иммуноглобулинов	
M1ss	AAGCAGTGGTATCAACGCA
Spx_IgA_pcr1	ATTGGGCAGCCCTGATTCTCAGGGGGTAGACATCG
Spx_IgM_pcr1	ATTGGGCAGCCCTGATTACGAGGGGGAAGACAGTTG
Spx_IgG_pcr1	ATTGGGCAGCCCTGATTGAAGTAGCCCTTKACYAGGCA
Второй раунд амплификации кДНК библиотек иммуноглобулинов	
M1S	(N) ₄₋₆ (XXXXX)CAGTGGTATCAACGCAGAG
Z	(N) ₄₋₆ (XXXXX)ATTGGGCAGCCCTGATT

Таблица 2 Список отсеквенированных образцов

Название	Вид	Возраст	Тип данных	Платформа	Количество прочтений
Spх1	Spalax galili	5 дней	TCRA	MiSeq 350+250	159903
			TCRB	MiSeq 350+250	70774
Spх2	Spalax galili	5 дней	TCRA	MiSeq 350+250	240630
			TCRB	MiSeq 350+250	238594
Spх3	Spalax galili	5 дней	TCRA	MiSeq 350+250	219946
			TCRB	MiSeq 350+250	162298
Spх6	Spalax galili	21 день	TCRA	MiSeq 350+250	390071
			TCRB	MiSeq 350+250	552449
Spх7	Spalax galili	21 день	PHKсек	NextSeq550 150+150	10959968
Spх10	Spalax galili	13 дней	PHKсек	NextSeq550 150+150	7427635
Spх11	Spalax galili	4 года	TCRA	HiSeq4000	10504175

				150+150	
			TCRB	HiSeq4000 150+150	6135056
			IGA	MiSeq 300+300	61189
			IGM	MiSeq 300+300	350278
			IGG	MiSeq 300+300	416400
Spx12	Spalax galili	3 года	TCRA	HiSeq4000 150+150	10287515
			TCRB	HiSeq4000 150+150	4104996
Spx13	Spalax galili	4 года	TCRA	HiSeq4000 150+150	11853453
			TCRB	HiSeq4000 150+150	6454037
			PHKсек	HiSeq4000 150+150	12974111
			IGA	MiSeq 300+300	63275
			IGM	MiSeq 300+300	433972
			IGG	MiSeq	357659

				300+300	
			IGH	HiSeq2500 300+300	5514437
Spx14	Spalax galili	4 года	TCRA	HiSeq4000 150+150	9929536
			TCRB	HiSeq4000 150+150	3595681
			PHKсек	HiSeq4000 150+150	10631414
			IGA	MiSeq 300+300	98774
			IGM	MiSeq 300+300	471257
			IGG	MiSeq 300+300	508287
			IGH	HiSeq2500 300+300	4955072
Spx15	Spalax galili	4 года	TCRA	MiSeq 350+250	2726112
			TCRB	MiSeq 350+250	619226
			PHKсек	HiSeq4000 150+150	11111856
			IGA	MiSeq	38265

				300+300	
			IGM	MiSeq 300+300	415000
			IGG	MiSeq 300+300	567081
			IGH	HiSeq2500 300+300	6651506
Spx16	Spalax galili	8 лет	TCRA	HiSeq4000 150+150	4707990
			TCRB	HiSeq4000 150+150	5727238
Spx17	Spalax galili	8 лет	IGH	HiSeq2500 300+300	5165670
Spx18	Spalax galili	8 лет	TCRA	MiSeq 350+250	253028
			TCRB	MiSeq 350+250	226042
			IGH	HiSeq2500 300+300	2050912
Spx19	Spalax galili	8 лет	TCRA	MiSeq 350+250	441330
			TCRB	MiSeq 350+250	425282
			IGH	HiSeq2500	4406560

				300+300	
Spx20	Spalax galili	8 лет	TCRA	MiSeq 350+250	541474
			TCRB	MiSeq 350+250	360942
			PHKсек	NextSeq550 150+150	7035344
Spx21	Spalax galili	17.5 лет	TCRA	HiSeq4000 150+150	6804208
			TCRB	HiSeq4000 150+150	2303923
			IGH	HiSeq2500 300+300	3966932
			PHKсек	HiSeq4000 150+150	11061188
Spx22	Spalax galili	12 лет	TCRA	MiSeq 350+250	400351
			TCRB	MiSeq 350+250	200183
Spx23	Spalax galili	14 лет	TCRA	HiSeq4000 150+150	7403649
			TCRB	HiSeq4000 150+150	4462245
Spx24	Spalax galili	12 лет	TCRA	MiSeq	599224

				350+250	
			TCRB	MiSeq 350+250	376236
Spx25	Spalax galili	12 лет	PHKсек	HiSeq4000 150+150	9358508
			IGA	MiSeq 300+300	7603
			IGM	MiSeq 300+300	111212
			IGG	MiSeq 300+300	212755
			IGH	HiSeq2500 300+300	8595989
Spx26	Spalax galili	15 лет	TCRA	HiSeq4000 150+150	5481542
			TCRB	HiSeq4000 150+150	4447035
			PHKсек	HiSeq4000 150+150	10203361
			IGA	MiSeq 300+300	4516
			IGM	MiSeq 300+300	152901
			IGG	MiSeq	203740

				300+300	
			IGH	HiSeq2500 300+300	10688108
Spx28	Spalax galili	21 день	TCRA	HiSeq4000 150+150	6197830
			TCRB	HiSeq4000 150+150	4684041
			PHKсек	HiSeq4000 150+150	8930276
			PHKсек	NextSeq550 150+150	11558872
			IGH	HiSeq2500 300+300	2522657
Spx29	Spalax galili	21 день	TCRA	HiSeq4000 150+150	1919480
			TCRB	HiSeq4000 150+150	2846714
			PHKсек	HiSeq4000 150+150	9929054
			IGH	HiSeq2500 300+300	2049534
Spx30	Spalax galili	21 день	PHKсек	HiSeq4000 150+150	13506248
			IGH	HiSeq2500	1495538

				300+300	
Spx31	Spalax galili	14 дней	PHKсек	NextSeq550 150+150	12574744
m1	Mus Musculus	3 мес	TCRA	HiSeq4000 150+150	1302854
			TCRB	HiSeq4000 150+150	2980868
			IGH	HiSeq2500 300+300	2568565
m2	Mus Musculus	3 мес	TCRA	HiSeq4000 150+150	1062752
			TCRB	HiSeq4000 150+150	2412606
			IGH	HiSeq2500 300+300	4212215
m3	Mus Musculus	3 мес	TCRA	HiSeq4000 150+150	1257582
			TCRB	HiSeq4000 150+150	3152219
			IGH	HiSeq2500 300+300	3309155
m4	Mus Musculus	3 мес.	TCRA	HiSeq4000 150+150	1192739
			TCRB	HiSeq4000	3062087

				150+150	
m5	Mus Musculus	3 мес.	TCRA	HiSeq4000 150+150	1358631
			TCRB	HiSeq4000 150+150	2839993
m6	Mus Musculus	1 год	TCRA	HiSeq4000 150+150	1369152
			TCRB	HiSeq4000 150+150	2750398
			IGH	HiSeq2500 300+300	2726464
m7	Mus Musculus	1 год	TCRA	HiSeq4000 150+150	1295286
			TCRB	HiSeq4000 150+150	2733237
			IGH	HiSeq2500 300+300	3561895
m8	Mus Musculus	1 год	TCRA	HiSeq4000 150+150	1260144
			TCRB	HiSeq4000 150+150	2942417
m9	Mus Musculus	1 год	TCRA	HiSeq4000 150+150	1171185
			TCRB	HiSeq4000	3019461

				150+150	
			IGH	HiSeq2500 300+300	3289966
m10	Mus Musculus	2 года	TCRA	HiSeq4000 150+150	1246526
			TCRB	HiSeq4000 150+150	2616073
m11	Mus Musculus	2 года	TCRA	HiSeq4000 150+150	1322561
			TCRB	HiSeq4000 150+150	3171525
m12	Mus Musculus	2 года	TCRA	HiSeq4000 150+150	1289241
			TCRB	HiSeq4000 150+150	3029580
			IGH	HiSeq2500 300+300	3218218
m13	Mus Musculus	2 года	TCRA	HiSeq4000 150+150	920249
			TCRB	HiSeq4000 150+150	3482749
			IGH	HiSeq2500 300+300	4357738
m14	Mus	2 года	TCRA	HiSeq4000	1162344

	Musculus			150+150	
			TCRB	HiSeq4000 150+150	2543928
			IGH	HiSeq2500 300+300	1951331
m2_NB	Mus Musculus	новорожд енные	TCRA	MiSeq 150+150	1430719
			TCRB	MiSeq 150+150	676960
m3_NB	Mus Musculus	новорожд енные	TCRA	MiSeq 150+150	625789
			TCRB	MiSeq 150+150	1295327
m4_NB	Mus Musculus	новорожд енные	TCRA	MiSeq 150+150	855598
			TCRB	MiSeq 150+150	599696
			IGH	HiSeq2500 300+300	3547613
			PHKсек	HiSeq2500 300+300	3439977
m5_NB	Mus Musculus	новорожд енные	TCRA	MiSeq 150+150	426086
			TCRB	MiSeq	1560396

				150+150	
			PHKсек	HiSeq2500 300+300	14143698
m6_NB	Mus Musculus	новорожд енные	TCRA	MiSeq 150+150	688561
			TCRB	MiSeq 150+150	1656555
			IGH	HiSeq2500 300+300	6721430
m7_NB	Mus Musculus	новорожд енные	TCRA	MiSeq 150+150	1027800
			TCRB	MiSeq 150+150	1308891
			PHKсек	HiSeq2500 300+300	18650228
m8_NB	Mus Musculus	новорожд енные	TCRA	MiSeq 150+150	1197201
			TCRB	MiSeq 150+150	2512563
			IGH	HiSeq2500 300+300	6910900
			PHKсек	HiSeq2500 300+300	16281356

Таблица 3 Список антител

Маркер	Клон	Метка	Видовая специфичность	Производитель
CD3 ζ	G4.18	PE	Крыса	BD
CD3	1F4	PE	Крыса	Biolegend
CD3 $\zeta\epsilon\gamma$	REA223	PE	Крыса	Miltenyi Biotec
CD3 ϵ	PC3/188A	PE	Человек, Крыса, Свинья, Корова, Курица, Лошадь, Морская свинка, Кролик	Novus
CD3 ϵ	145-2C11	APC	МЫШЬ	Sigma-Aldrich
CD3	17A2	APC	МЫШЬ	ThermoFisher
CD4	GK1.5	PerCP/Vio700	МЫШЬ	BD
CD4	RM4-4	PerCP/Cy5.5	МЫШЬ	BD
CD4	OX35	Fitc	Крыса	Biolegend
CD4	OX38	Fitc	Крыса	Biolegend
CD4	W3/25	Fitc	Крыса	Biolegend
CD4	REA489	Fitc	Крыса	Miltenyi Biotec
CD4	RM4-5	BriliantViolet421	МЫШЬ	Biolegend
CD8 α	OX8	Fitc	Крыса	Biolegend
CD8 α	G28	APC	Крыса	Biolegend
CD8 β	342	Fitc	Крыса	GenTex

CD62L	OX85	APC	Крыса	Biolegend
CD62L	RMP-1	APC	Мышь, крыса	Biolegend
CD44	IM7	VioBlue	Мышь	BD
CD19	6D5	Violet421	Мышь	Biolegend

12. Благодарности

Автор работы выражает благодарность сотрудникам отдела Адаптивного иммунитета Института Биоорганической Химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии Наук, где выполнялась работа. Научному руководителю Британовой Ольге Владимировне и научному консультанту Чудакову Дмитрию Михайловичу.

Также, благодарю сотрудников Института Эволюции и Отделения Эволюционной Биологии и Экологии Университета Хайфы (Израиль), где выполнялась часть работы, в особенности заведующего лабораторией профессора Имада Шамса.