

ОЦЕНКА ЧИСЛА ВИЧ-СПЕЦИФИЧНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ ПО ДАННЫМ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ РЕПЕРТУАРОВ Т-КЛЕТОЧНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

А. В. Елисеев, А. Д. Федорова, М. Ю. Лебедин, Д. М. Чудаков, М. А. Шугай ✉

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Детальное изучение механизмов формирования иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) необходимо для лучшего понимания процессов развития иммунодефицита у пациентов с ВИЧ-инфекцией, разработки эффективных методов ее иммунотерапии и новых вакцин против вируса. В исследовании нами были проанализированы данные ранее полученных результатов секвенирования репертуаров Т-клеточных рецепторов для большого числа здоровых индивидуумов (601 донор из американской популяции и 65 доноров из российской популяции) с целью определения частоты наивных Т-лимфоцитов, обладающих специфичностью к ВИЧ, в популяции. Мы обнаружили, что на уровне популяции имеет место значительная вариабельность между различным эпитопами ВИЧ в частотах специфических Т-клеток (F -statistic = 2007, $p < 10^{-100}$, ANOVA). Несмотря на то, что частота Т-лимфоцитов, специфических к одному и тому же эпитопу, была достаточно стабильной между индивидуумами, мы обнаружили, что она значительно зависит от таких факторов, как наличие у человека определенных аллелей HLA ($p < 0,01$, пост-хок тест Тьюки), наличие цитомегаловирусной инфекции ($F = 61$, $p = 7 \times 10^{-15}$, ANOVA), а также возраст (коэффициент корреляции Пирсона в диапазоне от $-0,53$ до $-0,14$ для разных групп).

Ключевые слова: ВИЧ, Т-клеточный рецептор, HLA, CMV, высокопроизводительное секвенирование

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 17-15-01495.

✉ **Для корреспонденции:** Шугай Михаил Александрович
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, Москва, 117997; mikhail.shugay@gmail.com

Статья получена: 23.10.2017 **Статья принята к печати:** 28.10.2017

ESTIMATING THE NUMBER OF HIV-SPECIFIC T-CELLS IN HEALTHY DONORS USING HIGH-THROUGHPUT SEQUENCING PROFILES OF T-CELL RECEPTOR REPERTOIRES

Eliseev AV, Fedorova AD, Lebedin MY, Chudakov DM, Shugay M ✉

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

In-depth study of mechanisms of immune response to the human immunodeficiency virus (HIV) is critical for better understanding of how immunodeficiency develops in patients with HIV, as well as for designing effective immunotherapy strategies and vaccines against the virus. In this work we analyze sequencing profiles of T-cell receptor repertoires previously obtained from healthy donors (601 Americans and 65 Russians) to estimate the population frequency of HIV-specific naive T-cells. We demonstrate that frequencies of T-cells recognizing different HIV epitopes vary considerably across the population (F -statistic = 2007, $p < 10^{-100}$, ANOVA). Although the frequency of T-lymphocytes recognizing a particular epitope does not change significantly between the individuals, it still largely depends on the presence of certain HLA alleles ($p < 0.01$, post-hoc Tukey's test), cytomegalovirus infection ($F = 61$, $p = 7 \times 10^{-15}$, ANOVA), and age (Pearson correlation coefficient ranging from -0.53 to -0.14 in different groups).

Keywords: HIV, T-cell receptor, HLA, CMV, high-throughput sequencing

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 17-15-01495).

✉ **Correspondence should be addressed:** Mikhail Shugay
ul. Miklukho-Maklaya, d. 16/10, Moscow, Russia, 117997; mikhail.shugay@gmail.com

Received: 23.10.2017 **Accepted:** 28.10.2017

Высокая мутабельность вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) позволяет ему легко уходить от распознавания иммунной системой [1]. Тем не менее присутствие большого числа иммуногенных эпитопов ВИЧ [2] и протективных аллелей HLA (human leucocyte antigen) [3], а также феномен элитных контроллеров [4] указывают на потенциальную возможность иммунотерапии ВИЧ-инфекции. Хотя разработка протективной вакцины против ВИЧ до сих пор не увенчалась успехом, полученные данные показывают, что

Т-клеточная терапия по своему терапевтическому потенциалу близка к антиретровирусной терапии [5].

В данной работе мы исходим из концепции, согласно которой эффективный иммунный ответ индивида против ранее не встречавшегося патогена определяется наличием и количеством специфических Т-клеток в пуле наивных Т-лимфоцитов [6]. Понимание того, какие эпитопы ВИЧ при определенном наборе аллелей HLA донора наиболее благоприятны для распознавания вируса иммунной

системой, позволит в конечном итоге определить механизмы иммунной протекции против ВИЧ и продвинуться в разработке эффективных вакцин против него.

Способность Т-лимфоцитов распознавать чужеродные антигены закодирована в генах альфа- и бета-цепей Т-клеточного рецептора (T-cell receptor, TCR), обладающих невероятным разнообразием: число уникальных последовательностей (вариантов) только для бета-цепи одного человека может превышать 10^9 , а полное число исходно генерируемых тимусом вариантов TCR в человеческой популяции практически не ограничено [7]. Стремительно развивающиеся технологии массивированного секвенирования иммунных репертуаров (RepSeq) позволяют одновременно считывать миллионы последовательностей TCR в выбранном образце, например в пробе мононуклеарных клеток периферической крови [8]. Существующие методы сортировки Т-клеток, специфичных к выбранным антигенам, в первую очередь с использованием окрашивания Т-клеток МНС-мультиметрами [9], позволяют накапливать знания об антиген-специфичных TCR. Это открывает возможно-

сти для применения RepSeq с целью функционального анализа индивидуальных репертуаров TCR. Так, постоянно пополняемая база данных последовательностей TCR с известной специфичностью (VDJdb, [10]) уже сегодня может быть использована для *in silico* аннотации и оценки числа эпитоп-специфичных Т-клеток в данных RepSeq.

Следует отметить, что практически невозможно точно подсчитать численность антиген-специфичных Т-клеток среди наивных Т-лимфоцитов стандартными методами, такими как проточная цитометрия: ввиду малого размера популяции (зачастую — менее 1 % [11]), специфичной к одному эпитопу, требуется обогащение, которое может потенциально исказить результаты [12]. В то же время технология RepSeq позволяет уверенно фиксировать Т-клетки с частотой порядка 0,001 % [13].

Имея в распоряжении большие данные, содержащие последовательности TCR 65 доноров из российской и 601 донора из американской популяций, а также набор из 1 688 TCR, для которых показано распознавание эпитопов ВИЧ (см. раздел «Материалы и методы»), мы можем

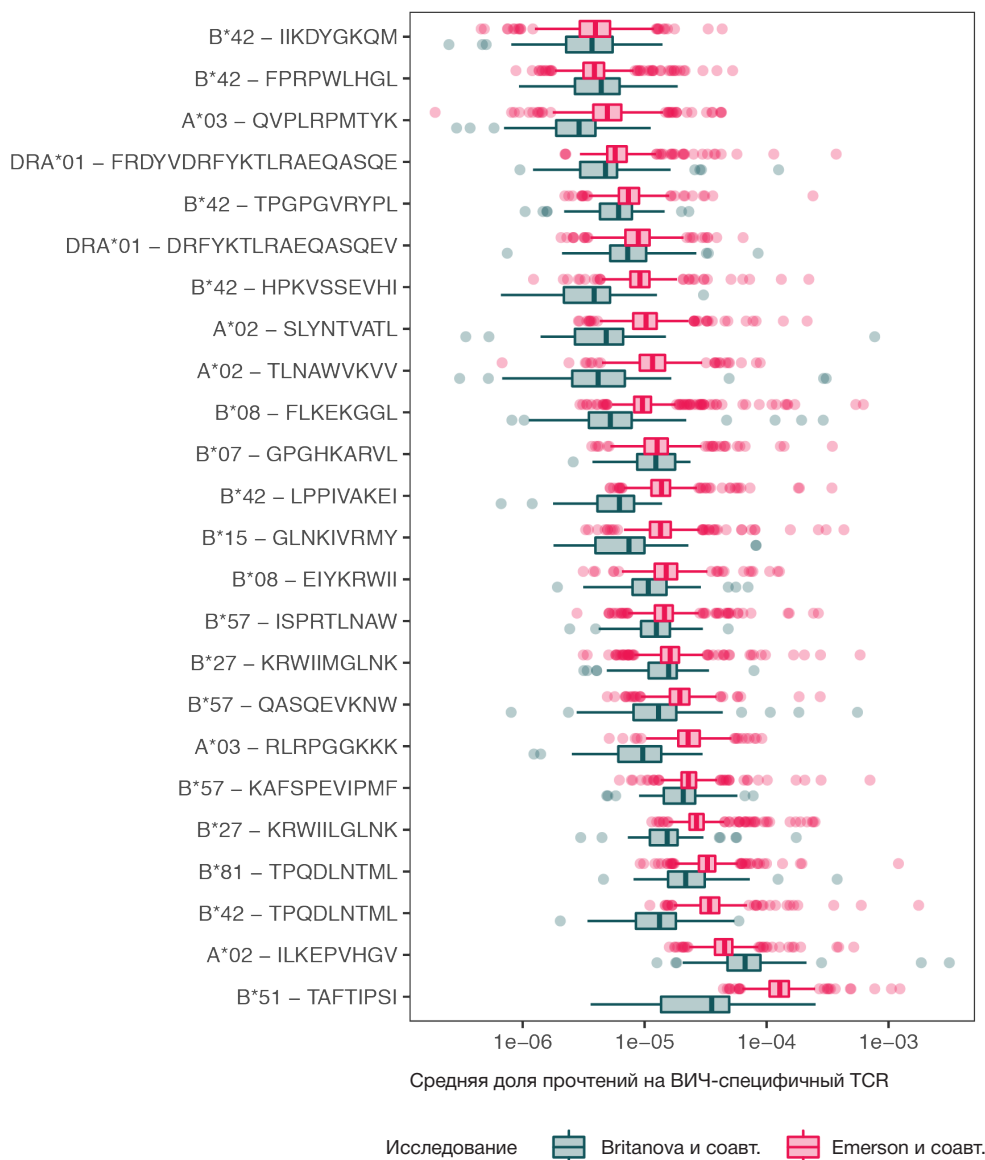


Рис. 1. Сравнение средней представленности Т-клеточных рецепторов (T-cell receptors, TCR), специфичных к определенным эпитопам ВИЧ, для Т-клеточных репертуаров из работ Emerson и соавт. [14] и Britanova и соавт. [15]. По оси X отложено распределение среднего размера клонотипа специфичной Т-клетки (фракции от всех прочтений бета-цепи TCR) в образцах из работ [14] (n = 65) и [15] (n = 601). По оси Y отложены эпитопы, для которых известны последовательности специфичных TCR (по данным VDJdb); формат записи — «аллель HLA : последовательность эпитопа»

изучить частоту ВИЧ-специфичных Т-клеток в популяции. В данной работе мы используем обозначенные данные для проверки следующих гипотез:

- 1) эпитопы ВИЧ значительно различаются по частоте специфичных Т-клеток в репертуарах TCR здоровых доноров;
- 2) наличие у донора цитомегаловирусной (cytomegalovirus, CMV) инфекции влияет на количество ВИЧ-специфичных Т-клеток;
- 3) число ВИЧ-специфичных Т-клеток зависит от присутствия у донора определенных аллелей HLA;
- 4) число ВИЧ-специфичных Т-клеток зависит от возраста и пола донора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали данные секвенирования бета-цепи TCR из работ Emerson и соавт. [14] и Britanova и соавт. [15]. Из работы Emerson и соавт. взяли только репертуары TCR доноров, для которых был определен гаплотип HLA и был известен CMV-статус — всего 601 образец. Из данных Britanova и соавт. исключили образцы пуповинной крови, в рассмотрение были взяты 65 образцов от взрослых здоровых доноров. Предобработку и картирование последовательностей TCR для данных из [15] провели с помо-

щью инструментов MIGEC [16] и MiTCR [17]. Для данных из [14] провели дополнительное картирование, уточнение V- и J-генов, а также выполнили коррекцию ошибок секвенирования в последовательностях TCR с использованием инструмента MiTCR [18]. Данные были очищены от нефункциональных, содержащих стоп-кодон или сдвиг рамки считывания, последовательностей с использованием инструмента VDJtools [19].

Аннотация данных, т. е. предсказание TCR, специфичных к ВИЧ, проводилась с использованием инструмента VDJtools/VDJdb-standalone [10]. Из VDJdb выбрали TCR, специфичные к эпитопам ВИЧ, причем рассматривали только те эпитопы, которые представлены в базе данных более чем 10 вариантами TCR. TCR из данных RepSeq считали специфичным к определенному эпитопу ВИЧ, если аминокислотная последовательность его гипервариабельного региона CDR3 отличалась не более чем на одну замену от соответствующего варианта TCR в базе данных VDJdb. Подобный метод позволяет значительно увеличить число аннотированных TCR при небольшой доле ошибочных аннотаций, как показано в [10].

Статистический анализ результатов проводили с использованием языка программирования R. В работе применили статистические тесты ANOVA, пост-хок тест Тьюки, а также корреляционный анализ. В разделе «Результаты исследования» для каждого теста приведены значения

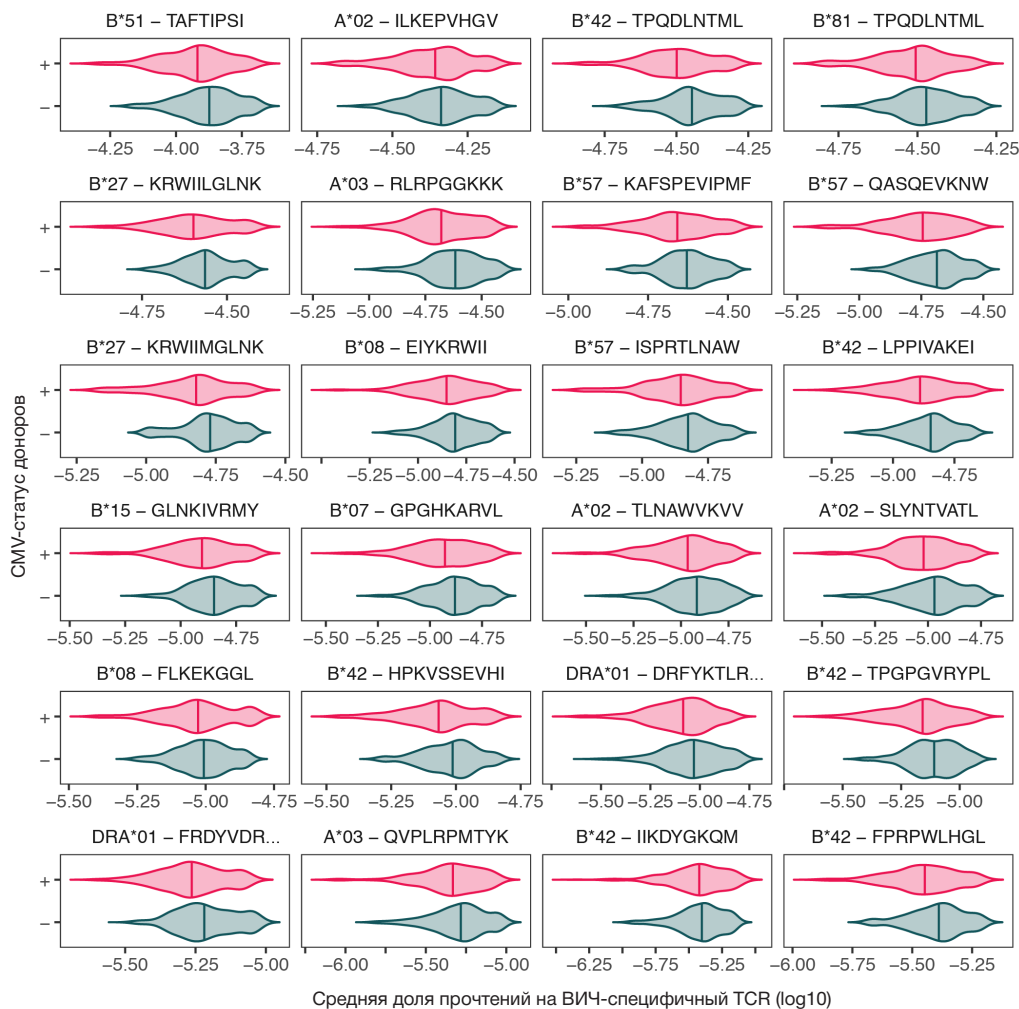


Рис. 2. Представленность ВИЧ-специфичных TCR в образцах от доноров с известным статусом по цитомегаловирусу. Результаты сравнительного анализа между CMV-положительными (+) и CMV-отрицательными донорами (-) приведены отдельно для каждого эпитопа. По оси X отложен десятичный логарифм среднего размера клонотипа специфичной Т-клетки (фракция от всех прочтений бета-цепи TCR). Данные винсоризованы для лучшей визуализации: показаны только образцы со значениями, лежащими между 5 % и 95 % перцентилями распределения

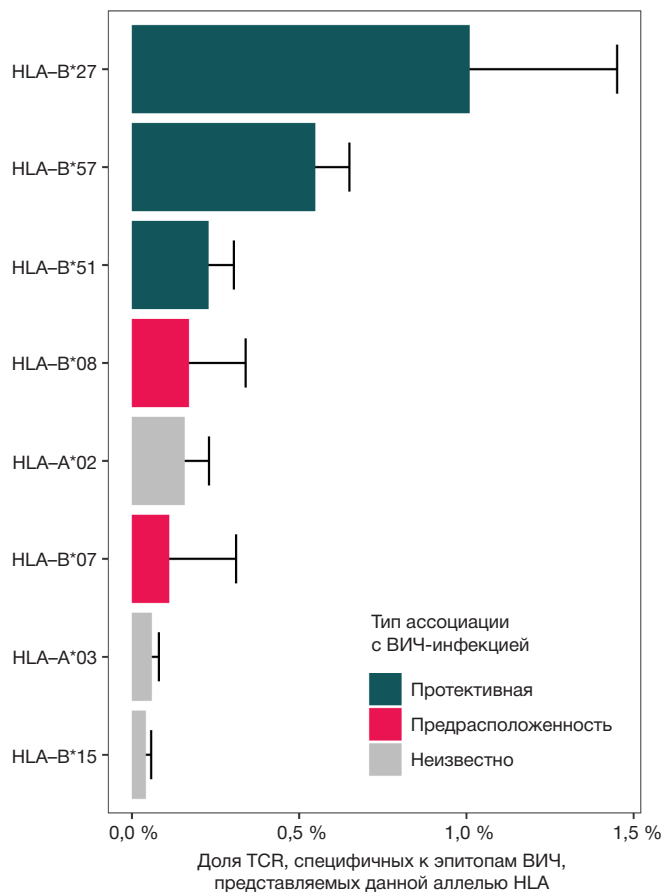


Рис. 3. Суммарная частота TCR, специфичных к эпитопам ВИЧ, которые могут быть представлены набором аллелей HLA донора (по данным Emerson и соавт.). По оси X отложен средний (по группам доноров, имеющих данный аллель HLA) процент от общего числа прочтений для последовательностей TCR, специфичных к эпитопам ВИЧ, представленных определенной аллелью HLA. Для каждого из значений также отображено стандартное отклонение. Список аллелей получен пересечением аллелей в базе VDJdb и аннотаций данных Emerson и соавт., аллель HLA-B*42 исключен, т. к. представлен только одним образцом, остальные аллели присутствуют у более чем 35 доноров из 601. Протективные аллели и аллели, связанные с предрасположенностью к ВИЧ-инфекции, взяты из обзора Goulder и Walker [3].

тестовой статистики (F-статистики для ANOVA и коэффициента корреляции Спирмена R) и статистической значимости (p-value).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценки частот TCR, специфичных к различным эпитопам, полученные методом проточной цитометрии, убедительно показывают, что доля специфичных T-клеток в наивном (интактном) репертуаре сильно варьирует и может различаться на 1–2 порядка между эпитопами, при этом она достаточно стабильна между различными донорами [12]. Наши результаты для данных высокопроизводительного секвенирования TCR (рис. 1) подтверждают эти наблюдения: мы видим сильную зависимость частоты специфичных TCR от эпитопа ($F = 2007$, $p < 10^{-100}$, ANOVA), что, однако, не связано с презентующим аллелем HLA ($F = 0,03$, $p = 0,86$, ANOVA). При этом для данных из работ Emerson и соавт. и Britanova и соавт. наблюдается сильный сдвиг между оценками частот специфичных TCR ($F = 1690$, $p < 10^{-100}$, в среднем частота выше для данных Emerson и соавт.), что может быть объяснено различиями в методике получения и структуре библиотек TCR. Так, в работе Emerson и со-

авт. использовали ДНК доноров и мультиплексную ПЦР, в то время как Britanova и соавт. использовали РНК, метод 5'RACE и молекулярное баркодирование [20]. Не вдаваясь в детальное описание различий приведенных выше методов, следует отметить, что молекулярное баркодирование позволяет значительно улучшить точность определения количества определенного TCR в образце [15].

Структура исследования Emerson и соавт. включала разделение доноров на две когорты по серологическому статусу — наличию или отсутствию цитомегаловирусной инфекции. Воспользовавшись этим, мы оценили влияние CMV-инфекции на частоту ВИЧ-специфичных TCR в репертуарах доноров. Как видно из рис. 2, частота ВИЧ-специфичных TCR выше для CMV-отрицательных доноров независимо от эпитопа ВИЧ, и отмеченное различие имеет высокий уровень статистической значимости ($F = 495$, $p < 10^{-100}$, ANOVA). Следует отметить, что вариант анализа, при котором не учитывается разница в частоте ВИЧ-специфичных TCR между эпитопами, т. е. сравнение проводится для всех TCR без группировки по эпитопу, дает результат с намного меньшим уровнем статистической значимости ($F = 61$, $p = 7 \times 10^{-15}$, ANOVA).

Наличие информации о HLA-гаплотипе доноров в работе Emerson и соавт. позволило оценить число ВИЧ-специфичных TCR, учитывая совпадение аллелей HLA, способных представлять распознаваемый эпитоп ВИЧ, и аллелей HLA донора. Как видно из рис. 3, наибольшая доля ВИЧ-специфичных TCR наблюдается для аллелей HLA B27, B57 и B51, считающихся протективными [3]. Для этих 3 аллелей характерно статистически значимое увеличение числа ВИЧ-специфичных TCR по сравнению с 5 остальными ($p < 0,01$, пост-хок тест Тьюки), кроме различий между B51 и B08. Следует отметить, что достаточно малое количество анализируемых аллелей HLA обусловлено отсутствием для других аллелей известных эпитопов ВИЧ в базе VDJdb.

Возрастные изменения в структуре T-клеточного репертуара были описаны в ряде ранее опубликованных работ [21], результаты которых можно свести к наблюдаемому падению разнообразия репертуара из-за клональных экспансий, вызванных хроническими инфекциями. Подобное падение разнообразия приводит к уменьшению числа T-клеток, специфичных к ранее не встречавшимся патогенам, что также наблюдается для ВИЧ-специфичных T-клеток (рис. 4): $R = -0,35$ ($p = 0,003$, здесь и далее — коэффициент корреляции Спирмена) для данных из работы Britanova и соавт. и $R = -0,20$ ($p = 0,001$) для CMV-отрицательных доноров из работы Emerson и соавт. В то же время для CMV-положительных доноров наблюдается менее выраженное падение числа ВИЧ-специфичных T-клеток ($R = -0,14$, $p = 0,03$). Крупные клональные экспансии ($> 5\%$ прочтений TCR), наблюдаемые у CMV+ доноров из работы Emerson и соавт., могут быть объяснены кросс-реактивностью ВИЧ-специфичных клонотипов к эпитопам CMV. Данные Britanova и соавт. показывают падение числа специфичных T-клеток для мужчин ($R = -0,53$, $p = 0,002$), но не для женщин ($p = 0,22$), в основном обусловленное наличием среди них долгожительниц (возраст 80–100 лет), обладающих специфическими свойствами репертуара [15].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Как показывают наши результаты, медианная частота ВИЧ-специфичных T-клеток в популяции здоровых доноров может различаться на 1–2 порядка в зависимости от

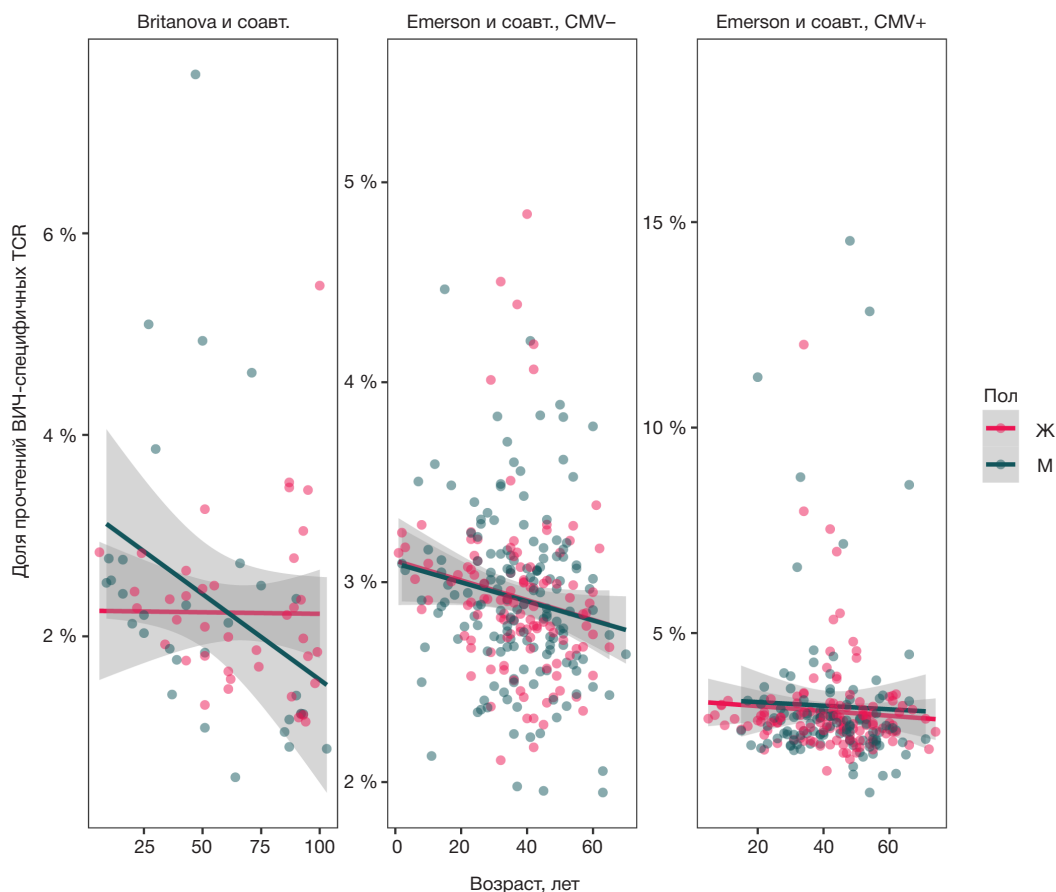


Рис. 4. Изменение суммарной частоты ВИЧ-специфичных TCR у доноров разного пола в зависимости от возраста. Данные из исследования Emerson и соавт. распределены по группам в соответствии с CMV-статусом доноров. На графике также приведены результаты линейного моделирования зависимости частоты ВИЧ-специфичных TCR от возраста для мужчин и женщин

рассматриваемых эпитопов ВИЧ, что хорошо согласуется с оценками, ранее полученными другими методами [11, 12, 22]. При этом частота Т-клеток, специфичных к определенному эпитопу, отличается для разных доноров в значительно меньшей степени.

Следует отметить, что одним из основных факторов, определяющих частоту той или иной последовательности TCR в популяции, является вероятность сборки данной последовательности в ходе V(D)J-рекомбинации [7]. Этот процесс хорошо описывается существующими статистическими моделями [23], которые показывают, что параметры данного процесса достаточно стабильны между индивидами, и это согласуется с нашими результатами. Эти наблюдения говорят в пользу того, что оценка частоты ВИЧ-специфичных Т-клеток, полученная *in silico*, является важной и надежной характеристикой потенциала иммунного ответа против определенных эпитопов на популяционном уровне.

Таким образом, наши результаты предполагают, что для разработки эффективной стратегии вакцинации следует учитывать как пул эпитопов, которые могут быть представлены в контексте аллелей HLA конкретного индивида, так и наличие в иммунной системе достаточного числа наивных Т-клеток, распознающих эти эпитопы.

При анализе частот Т-клеток, способных распознавать эпитопы ВИЧ в контексте известных HLA донора, нами были обнаружены значительные различия по ним для разных HLA. При этом обнаруженные нами аллели HLA с наибольшей частотой ВИЧ-специфичных TCR соответствуют перечню протективных аллелей, приведенному в [23].

Кроме того, нами было обнаружено значительное снижение частоты ВИЧ-специфичных Т-клеток с возрастом и у доноров с CMV-инфекцией. Эти результаты согласуются с более общими наблюдениями уменьшения разнообразия Т-клеточного репертуара, вызванного старением и хроническими инфекциями, такими как CMV [24–26]. Следует отметить, что сравнение групп разного пола дает противоречивые результаты между исследованиями Emerson и соавт. и Britanova и соавт., обусловленное наличием когорты женщин-долгожителей во второй работе.

Выводы

Наше исследование показывает, что технология секвенирования иммунных репертуаров и соответствующий биоинформатический анализ позволяют детально изучить антиген-специфичные Т-клетки в репертуарах. Использование технологии RepSeq позволяет оценить частоту ВИЧ-специфичных Т-клеток в репертуарах здоровых доноров и определить факторы, которые влияют на этот показатель. С ростом базы данных аннотированных последовательностей TCR VDJdb данное исследование может быть дополнено результатами для новых эпитопов ВИЧ и аллелей HLA. В будущем изучение репертуаров TCR ВИЧ-инфицированных доноров с различными аллелями HLA, в том числе доноров-контроллеров, позволит определить, какие из ВИЧ-специфичных TCR, наблюдаемых в репертуаре наивных Т-лимфоцитов, имеют повышенную частоту и ассоциированы с контролем ВИЧ-инфекции.

Литература

- Barton JP, Goonetilleke N, Butler TC, Walker BD, McMichael AJ, Chakraborty AK. Relative rate and location of intra-host HIV evolution to evade cellular immunity are predictable. *Nat Commun.* 2016 May 23; 7: 11660. DOI: 10.1038/ncomms11660.
- Blanco-Heredia J, Lecanda A, Valenzuela-Ponce H, Brander C, Ávila-Ríos S, Reyes-Terán G. Identification of Immunogenic Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes Containing Drug Resistance Mutations in Antiretroviral Treatment-Naive HIV-Infected Individuals. *PLoS One.* 2016 Jan 25; 11 (1): e0147571. DOI: 10.1371/journal.pone.0147571.
- Goulder PJ, Walker BD. HIV and HLA class I: an evolving relationship. *Immunity.* 2012 Sep 21; 37 (3): 426–40. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.09.005.
- Genovese L, Nebuloni M, Alfano M. Cell-Mediated Immunity in Elite Controllers Naturally Controlling HIV Viral Load. *Front Immunol.* 2013 Apr 9; 4: 86. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00086.
- Lam S, Bollard C. T-cell therapies for HIV. *Immunotherapy.* 2013 Apr; 5 (4): 407–14. DOI: 10.2217/imt.13.23.
- Jenkins MK, Moon JJ. The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *J Immunol.* 2012 May 1; 188 (9): 4135–40. DOI: 10.4049/jimmunol.1102661.
- Mora T, Walczak A. Quantifying lymphocyte receptor diversity. *ArXiv e-prints Abstract Service [Интернет].* 2016 Apr [дата обращения: 2 октября 2017 г.]; eprint arXiv:1604.00487. Доступно по: <http://adsabs.harvard.edu/abs/2016arXiv160400487M>.
- Heather JM, Ismail M, Oakes T, Chain B. High-throughput sequencing of the T-cell receptor repertoire: pitfalls and opportunities. *Brief Bioinform.* 2017 Jan 10. pii: bbw138. DOI: 10.1093/bib/bbw138.
- Sims S, Willberg C, Klenerman P. MHC-peptide tetramers for the analysis of antigen-specific T cells. *Expert Rev Vaccines.* 2010 Jul; 9 (7): 765–74. DOI: 10.1586/erv.10.66.
- Shugay M, Bagaev DV, Zvyagin IV, Vroomans RM, Crawford JC, Dolton G, et al. VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity. *Nucleic Acids Res.* 2017 Sep 1. DOI: 10.1093/nar/gkx760.
- Bacher P, Scheffold A. Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. *Cytometry A.* 2013 Aug; 83 (8): 692–701. DOI: 10.1002/cyto.a.22317.
- Neller MA, Ladell K, McLaren JE, Matthews KK, Gostick E, Pentier JM, et al. Naive CD8+ T-cell precursors display structured TCR repertoires and composite antigen-driven selection dynamics. *Immunol Cell Biol.* 2015 Aug; 93 (7): 625–33. DOI: 10.1038/icb.2015.17.
- Kotrova M, Muzikova K, Mejstrikova E, Novakova M, Bakardjieva-Mihaylova V, Fiser K, et al. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. *Blood.* 2015 Aug 20; 126 (8): 1045–7. DOI: 10.1182/blood-2015-07-655159.
- Emerson RO, DeWitt WS, Vignali M, Gravley J, Hu JK, Osborne EJ, et al. Immunosequencing identifies signatures of cytomegalovirus exposure history and HLA-mediated effects on the T cell repertoire. *Nat Genet.* 2017 May; 49 (5): 659–65. DOI: 10.1038/ng.3822.
- Britanova OV, Shugay M, Merzlyak EM, Staroverov DB, Putintseva EV, Turchaninova MA, et al. Dynamics of Individual T Cell Repertoires: From Cord Blood to Centenarians. *J Immunol.* 2016 Jun 15; 196 (12): 5005–13. DOI: 10.4049/jimmunol.1600005.
- Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR, et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat Methods.* 2014 Jun; 11 (6): 653–5. DOI: 10.1038/nmeth.2960.
- Bolotin DA, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV, Turchaninova MA, Zvyagin IV, et al. MiTCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis. *Nat Methods.* 2013 Sep; 10 (9): 813–4. DOI: 10.1038/nmeth.2555.
- Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV, et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat Methods.* 2015 May; 12 (5): 380–1. DOI: 10.1038/nmeth.3364.
- Shugay M, Bagaev DV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Britanova OV, Putintseva EV, et al. VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. *PLoS Comput Biol.* 2015 Nov 25; 11 (11): e1004503. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004503.
- Friedensohn S, Khan TA, Reddy ST. Advanced Methodologies in High-Throughput Sequencing of Immune Repertoires. *Trends Biotechnol.* 2017 Mar; 35 (3): 203–14. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.09.010.
- Goronzy JJ, Qi Q, Olshen RA, Weyand CM. High-throughput sequencing insights into T-cell receptor repertoire diversity in aging. *Genome Med.* 2015 Nov 19; 7 (1): 117. DOI: 10.1186/s13073-015-0242-3.
- Obar JJ, Khanna KM, Lefrançois L. Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity.* 2008 Jun; 28 (6): 859–69. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.04.010.
- Murugan A, Mora T, Walczak AM, Callan CG Jr. Statistical inference of the generation probability of T-cell receptors from sequence repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Oct 2; 109 (40): 16161–6. DOI: 10.1073/pnas.1212755109.
- Aiello AE, Chiu YL, Frasca D. How does cytomegalovirus factor into diseases of aging and vaccine responses, and by what mechanisms? *Geroscience.* 2017 Jun; 39 (3): 261–71. DOI: 10.1007/s11357-017-9983-9.
- Merani S, Pawelec G, Kuchel GA, McElhanev JE. Impact of Aging and Cytomegalovirus on Immunological Response to Influenza Vaccination and Infection. *Front Immunol.* 2017 Jul 17; 8: 784. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00784.
- Tu W, Rao S. Mechanisms Underlying T Cell Immunosenescence: Aging and Cytomegalovirus Infection. *Front Microbiol.* 2016 Dec 27; 7: 2111. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02111.

References

- Barton JP, Goonetilleke N, Butler TC, Walker BD, McMichael AJ, Chakraborty AK. Relative rate and location of intra-host HIV evolution to evade cellular immunity are predictable. *Nat Commun.* 2016 May 23; 7: 11660. DOI: 10.1038/ncomms11660.
- Blanco-Heredia J, Lecanda A, Valenzuela-Ponce H, Brander C, Ávila-Ríos S, Reyes-Terán G. Identification of Immunogenic Cytotoxic T Lymphocyte Epitopes Containing Drug Resistance Mutations in Antiretroviral Treatment-Naive HIV-Infected Individuals. *PLoS One.* 2016 Jan 25; 11 (1): e0147571. DOI: 10.1371/journal.pone.0147571.
- Goulder PJ, Walker BD. HIV and HLA class I: an evolving relationship. *Immunity.* 2012 Sep 21; 37 (3): 426–40. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.09.005.
- Genovese L, Nebuloni M, Alfano M. Cell-Mediated Immunity in Elite Controllers Naturally Controlling HIV Viral Load. *Front Immunol.* 2013 Apr 9; 4: 86. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00086.
- Lam S, Bollard C. T-cell therapies for HIV. *Immunotherapy.* 2013 Apr; 5 (4): 407–14. DOI: 10.2217/imt.13.23.
- Jenkins MK, Moon JJ. The role of naive T cell precursor frequency and recruitment in dictating immune response magnitude. *J Immunol.* 2012 May 1; 188 (9): 4135–40. DOI: 10.4049/jimmunol.1102661.
- Mora T, Walczak A. Quantifying lymphocyte receptor diversity. *ArXiv e-prints Abstract Service [Интернет].* 2016 Apr [cited 2017 Oct 2]; eprint arXiv:1604.00487. Available from: <http://adsabs.harvard.edu/abs/2016arXiv160400487M>.
- Heather JM, Ismail M, Oakes T, Chain B. High-throughput sequencing of the T-cell receptor repertoire: pitfalls and opportunities. *Brief Bioinform.* 2017 Jan 10. pii: bbw138. DOI: 10.1093/bib/bbw138.

9. Sims S, Willberg C, Klenerman P. MHC-peptide tetramers for the analysis of antigen-specific T cells. *Expert Rev Vaccines*. 2010 Jul; 9 (7): 765–74. DOI: 10.1586/erv.10.66.
10. Shugay M, Bagaev DV, Zvyagin IV, Vroomans RM, Crawford JC, Dolton G, et al. VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity. *Nucleic Acids Res*. 2017 Sep 1. DOI: 10.1093/nar/gkx760.
11. Bacher P, Scheffold A. Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. *Cytometry A*. 2013 Aug; 83 (8): 692–701. DOI: 10.1002/cyto.a.22317.
12. Neller MA, Ladell K, McLaren JE, Matthews KK, Gostick E, Pentier JM, et al. Naive CD8+ T-cell precursors display structured TCR repertoires and composite antigen-driven selection dynamics. *Immunol Cell Biol*. 2015 Aug; 93 (7): 625–33. DOI: 10.1038/icb.2015.17.
13. Kotrova M, Muzikova K, Mejstrikova E, Novakova M, Bakardjieva-Mihaylova V, Fiser K, et al. The predictive strength of next-generation sequencing MRD detection for relapse compared with current methods in childhood ALL. *Blood*. 2015 Aug 20; 126 (8): 1045–7. DOI: 10.1182/blood-2015-07-655159.
14. Emerson RO, DeWitt WS, Vignali M, Gravley J, Hu JK, Osborne EJ, et al. Immunosequencing identifies signatures of cytomegalovirus exposure history and HLA-mediated effects on the T cell repertoire. *Nat Genet*. 2017 May; 49 (5): 659–65. DOI: 10.1038/ng.3822.
15. Britanova OV, Shugay M, Merzlyak EM, Staroverov DB, Putintseva EV, Turchaninova MA, et al. Dynamics of Individual T Cell Repertoires: From Cord Blood to Centenarians. *J Immunol*. 2016 Jun 15; 196 (12): 5005–13. DOI: 10.4049/jimmunol.1600005.
16. Shugay M, Britanova OV, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Mamedov IZ, Tuganbaev TR, et al. Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat Methods*. 2014 Jun; 11 (6): 653–5. DOI: 10.1038/nmeth.2960.
17. Bolotin DA, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV, Turchaninova MA, Zvyagin IV, et al. MITCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis. *Nat Methods*. 2013 Sep; 10 (9): 813–4. DOI: 10.1038/nmeth.2555.
18. Bolotin DA, Poslavsky S, Mitrophanov I, Shugay M, Mamedov IZ, Putintseva EV, et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling. *Nat Methods*. 2015 May; 12 (5): 380–1. DOI: 10.1038/nmeth.3364.
19. Shugay M, Bagaev DV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Britanova OV, Putintseva EV, et al. VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires. *PLoS Comput Biol*. 2015 Nov 25; 11 (11): e1004503. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004503.
20. Friedensohn S, Khan TA, Reddy ST. Advanced Methodologies in High-Throughput Sequencing of Immune Repertoires. *Trends Biotechnol*. 2017 Mar; 35 (3): 203–14. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.09.010.
21. Goronzy JJ, Qi Q, Olshen RA, Weyand CM. High-throughput sequencing insights into T-cell receptor repertoire diversity in aging. *Genome Med*. 2015 Nov 19; 7 (1): 117. DOI: 10.1186/s13073-015-0242-3.
22. Obar JJ, Khanna KM, Lefrançois L. Endogenous naive CD8+ T cell precursor frequency regulates primary and memory responses to infection. *Immunity*. 2008 Jun; 28 (6): 859–69. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.04.010.
23. Murugan A, Mora T, Walczak AM, Callan CG Jr. Statistical inference of the generation probability of T-cell receptors from sequence repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Oct 2; 109 (40): 16161–6. DOI: 10.1073/pnas.1212755109.
24. Aiello AE, Chiu YL, Frasca D. How does cytomegalovirus factor into diseases of aging and vaccine responses, and by what mechanisms? *Geroscience*. 2017 Jun; 39 (3): 261–71. DOI: 10.1007/s11357-017-9983-9.
25. Merani S, Pawelec G, Kuchel GA, McElhaney JE. Impact of Aging and Cytomegalovirus on Immunological Response to Influenza Vaccination and Infection. *Front Immunol*. 2017 Jul 17; 8: 784. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00784.
26. Tu W, Rao S. Mechanisms Underlying T Cell Immunosenescence: Aging and Cytomegalovirus Infection. *Front Microbiol*. 2016 Dec 27; 7: 2111. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02111.