

# ИССЛЕДОВАНИЕ КЛОНАЛЬНОГО РЕПЕРТУАРА ФРАКЦИИ АКТИВИРОВАННЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТА С АНКИЛОЗИРУЮЩИМ СПОНДИЛИТОМ

Е. А. Комеч, Ю. Б. Лебедев, А. В. Кошенкова, Д. С. Сырко, Е. А. Мусаткина, С. А. Лукьянов, Д. М. Чудаков, И. В. Звягин <sup>✉</sup>

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

Недавние исследования клонального репертуара Т-клеток при анкилозирующем спондилите (АС) позволили идентифицировать группу клонов Т-лимфоцитов с высокоомологичной структурой Т-клеточного рецептора, ассоциированных с развитием АС. Определение роли Т-лимфоцитов в развитии заболевания требует исследований клонального состава функционально различных субпопуляций Т-клеток больных АС. С использованием современной технологии реконструкции клонального репертуара Т-клеток на базе массивированного параллельного секвенирования нами был впервые исследован клональный репертуар активированных Т-лимфоцитов периферической крови пациента с АС. Мы обнаружили высокое разнообразие клонального состава фракции Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры активации CD38 и HLA-DR, как по численности клеток, представляющих идентифицированные клонотипы, так и по структуре Т-клеточного рецептора клонотипов, что свидетельствует о разнообразной антигенной специфичности активированных Т-лимфоцитов периферической крови пациента. Основу клонального разнообразия составили малопредставленные в общем репертуаре клонотипы Т-клеток. В составе репертуара фракции был обнаружен ранее ассоциированный с АС и реактивным артритом клонотип TRBV9\_CASSVGVYSTDTQYF\_TRBJ2-3, а также ряд других клонотипов субпопуляций цитотоксических и хелперных Т-клеток, вероятно, связанных с воспалительным процессом при АС. Экспрессия маркеров активации клетками ассоциированных с АС клонотипов демонстрирует активное участие таких клонов в воспалительной реакции при заболевании, определяя актуальность исследования их антигенной специфичности и роли в возникновении и/или развитии АС.

**Ключевые слова:** Т-клеточный репертуар, анкилозирующий спондилит, активированные Т-лимфоциты, болезнь Бехтерева, субпопуляция Т-лимфоцитов, клональный репертуар

**Финансирование:** работа поддержана Министерством образования и науки РФ, идентификатор проекта RFMEFI60716X0158.

**Благодарности:** авторы выражают признательность пациенту, принявшему участие в исследовании; врачу-гематологу, профессору кафедры гематологии и терапии им. А. А. Максимова Денису Анатольевичу Федоренко из Национального медико-хирургического центра имени Н. И. Пирогова — за консультации по клиническим вопросам; старшему научному сотруднику Елене Ивановне Коваленко из Института биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова за помощь в осуществлении цитофлуорометрического анализа.

✉ **Для корреспонденции:** Звягин Иван Владимирович  
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; izvyagin@gmail.com

**Статья получена:** 15.12.2017 **Статья принята к печати:** 25.12.2017

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2018.001

## A STUDY OF THE REPERTOIRE OF ACTIVATED T-CELL CLONES OBTAINED FROM A PATIENT WITH ANKYLOSING SPONDYLITIS

Komech EA, Lebedev YB, Koshenkova AV, Syrko DS, Musatkina EA, Lukyanov SA, Chudakov DM, Zvyagin IV <sup>✉</sup>

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Recent studies of T-cell clonal repertoires of patients with ankylosing spondylitis (AS) have led to the discovery of AS-associated T-cell clones with a highly homologous T-cell receptor structure. The role of T-lymphocytes in the disease progression cannot be elucidated without analyzing the diversity and abundance of functionally different T-cell clones found in patient with AS. Using a state-of-the-art technique for T-cell repertoire profiling based on massively parallel sequencing, we, for the first time, studied the T-cell repertoire of activated T-cells from the peripheral blood of a patient with AS. We have demonstrated that a subpopulation of CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> T-lymphocytes is highly diverse both in terms of clonal diversity and abundance of the identified clonotypes, suggesting diverse antigen specificity of the activated peripheral blood T-cells. Most of the activated T-cell clonotypes had low abundance in total population of peripheral blood T-cells. In the repertoire of activated T-cells we have found the clonotype TRBV9\_CASSVGVYSTDTQYF\_TRBJ2-3, previously discovered in AS and reactive arthritis, and a few other clonotypes of cytotoxic and helper T-cells that may have a role in promoting inflammation in AS patients. Presence of the AS-associated clonotypes in activated T-cell subset suggests that the T-cells might play an active role in ongoing inflammation during the disease progression. This provides rationale for further research of their antigen specificity and role in triggering or maintaining AS.

**Keywords:** T-cell repertoire, ankylosing spondylitis, activated T lymphocytes, Bekhterev's disease, T-cell subpopulation, clonal repertoire

**Funding:** this work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Project ID RFMEFI60716X0158.

**Acknowledgement:** we are grateful to the patient who has kindly given his consent to participate in the study; to Denis Fedorenko, a hematologist and Professor of Maximov Hematology and Cell Therapy Department (Pirogov National Medical Surgical Center) for his consultations; Elena Kovalenko, a senior researcher at Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, for her assistance in conducting a flow cytometry analysis.

✉ **Correspondence should be addressed:** Ivan Zvyagin  
ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997; izvyagin@gmail.com

**Received:** 15.12.2017 **Accepted:** 25.12.2017

**DOI:** 10.24075/brsmu.2018.001

Анкилозирующий спондилит (АС, болезнь Бехтерева) — хроническое ревматологическое заболевание предположительно аутоиммунной природы. Согласно результатам исследований по поиску геномных ассоциаций, риск развития АС связан с определенными аллелями генов системы антиген-презентации (*HLA*, *ERAP1/2*), а также аллелями генов ряда рецепторов цитокинов, задействованных в провоспалительных реакциях [1]. Выявленная ассоциация риска развития АС с определенными аллелями гена *HLA-B*, одного из генов системы антиген-презентации, и наличие протективных вариантов *HLA-B* лежат в основе гипотезы возникновения АС в результате распознавания Т-клетками собственного антигена организма в комплексе с молекулой *HLA-B\*27* [2]. Недавние исследования клонального репертуара Т-клеток больных АС позволили определить группу клонов цитотоксических Т-лимфоцитов с высокотопологической структурой антиген-распознающей части Т-клеточного рецептора (ТКР), специфически обнаруживающихся в периферической крови и синовиальной жидкости пораженных суставов больных АС [3, 4]. Клоны Т-лимфоцитов со сходной и/или идентичной структурой антиген-распознающей части ТКР ранее были найдены в синовиальной жидкости пациентов с реактивным артритом — заболеванием, которое также относится к группе спондилоартропатий [5–7].

Существенный интерес представляет характеристика функционального состояния клеток клонов Т-лимфоцитов, предположительно связанных с началом и/или поддержанием воспалительного процесса. В настоящей работе мы исследовали клональную структуру и состав фракции активированных Т-лимфоцитов периферической крови пациента с анкилозирующим спондилитом на фоне активного течения заболевания. Для реконструкции клонального репертуара Т-клеток пациента мы применили современную технологию, которая основана на секвенировании нового поколения (*next-generation sequencing*, NGS) библиотек кДНК бета-цепей ТКР, подготовленных с использованием техники молекулярного баркодирования [8, 9], и позволяет анализировать клональный состав образца и количественную представленность сотен тысяч отдельных клонов Т-клеток. После реконструкции клонального репертуара Т-лимфоцитов фракции активированных Т-клеток крови и исследования общей структуры репертуара мы провели поиск опубликованных в настоящее время ассоциированных с АС клонов Т-клеток среди клонотипов исследуемой фракции. Для оценки представленности выявленных клонотипов в общем репертуаре периферической крови и их принадлежности к двум основным функциональным субпопуляциям Т-клеток также был реконструирован репертуар полной фракции и фракций  $CD4^+$ - и  $CD8^+$ -Т-лимфоцитов периферической крови пациента.

## ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

### Пациент

Пациент: мужчина 28 лет с диагнозом «центральная форма анкилозирующего спондилита (болезнь Бехтерева)», *HLA-B\*27+*-генотип. Диагноз был установлен за 7 лет до получения образцов периферической крови. Терапия: нестероидные противовоспалительные препараты (аркоксиа), метотрексат, ингибитор фактора некроза опухоли  $\alpha$  (препарат «Хумира»). За 3 года до сбора образцов крови была проведена высокодозная иммуносупрессивная терапия

(циклофосфан 200 мкг/кг + антитимоцитарный иммуноглобулин) с поддержкой аутологичными гемопоэтическими клетками (без обогащения по клеткам  $CD34^+$ -субпопуляции). Через полгода после иммуносупрессивной терапии было зафиксировано первое обострение заболевания на фоне перенесенной ОРВИ. На момент получения образцов крови пациент также находился в состоянии обострения, проявлявшегося в выраженных болевых ощущениях и сниженной подвижности пораженных суставов.

### Выделение лимфоцитарной фракции клеток и отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов

Периферическую кровь в объеме 8 мл собирали в вакуумные пробирки с КЗ-ЭДТА (Vacutainer, BD Biosciences, США). Мононуклеарную фракцию выделяли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла (1,077 г/см<sup>3</sup>, «ПанЭко», Россия). В один момент времени (временная точка 1) были получены два образца периферической крови одинакового объема для реконструкции полного репертуара Т-лимфоцитов в двух независимых повторностях (образцы F1 и F2). Из отдельных образцов периферической крови были выделены фракции  $CD4^+$ - и  $CD8^+$ -клеток с помощью набора реактивов Dynabeads (Invitrogen, США) для позитивной иммуномагнитной селекции.

Для реконструкции клонального репертуара с помощью проточной цитофлуориметрии (FACSVantage, BD Biosciences) из мононуклеарной фракции клеток крови были получены образцы клеток субпопуляции активированных Т-лимфоцитов периферической крови, определенной на основе экспрессии поверхностных маркеров дифференцировки  $CD38$  и  $HLA-DR$ . В точке 1 была выделена субпопуляция лимфоцитов  $CD3^+CD38^+HLA-DR^+$ . Через два месяца (временная точка 2) из периферической крови пациента были получены образцы клеток субпопуляций  $CD3^+CD8^+CD38^+HLA-DR^+$  и  $CD3^+CD8^-CD38^+HLA-DR^+$ . Для цитофлуориметрии использовались антитела  $CD3-APC$  (Invitrogen),  $CD8-FITC$  (Invitrogen),  $HLA-DR-PerCP$  (Invitrogen) и  $CD38-PE$  (IQProducts, Нидерланды) к поверхностным маркерам клеток человека. Окрашивание клеток антителами производили в соответствии с протоколами производителей. Клетки были собраны в 350 мкл буфера RLT (Qiagen, Нидерланды), после чего выделяли фракцию суммарной РНК.

### Подготовка библиотек кДНК и секвенирование

Выделение РНК фракции мононуклеарных клеток периферической крови, а также фракций  $CD4^+$ - и  $CD8^+$ -клеток периферической крови проводили с использованием реагента TRIzol (Invitrogen) по инструкции производителя. Выделение РНК фракций Т-лимфоцитов, полученных методом проточной цитофлуориметрии, проводили с использованием набора реактивов RNeasy Mini (Qiagen) по протоколу производителя. Подготовку библиотек кДНК бета-цепи ТКР проводили по ранее описанному протоколу [10]. кДНК библиотеки секвенировали на платформе HiSeq 2000/2500 (Illumina, США) в режиме парного чтения с длиной прочтения 100 нт.

### Обработка результатов секвенирования

Предварительная обработка результатов секвенирования включала коррекцию ошибок секвенирования и подсчет

числа уникальных молекул кДНК ТКР в библиотеке с помощью программного обеспечения MiGEC (на основе принципа молекулярного баркодирования) [8, 11]. Для определения V-, D- и J-сегментов, последовательности CDR3, подсчета численности клонотипов и формирования списка идентифицированных клонотипов для каждого образца использовали программное обеспечение MiXCR [12]. При восстановлении клонального репертуара образца использовали последовательности кДНК ТКР, прочитанные минимум дважды по результатам анализа последовательностей уникальных молекулярных меток (unique molecular identifier, UMI), что позволило устранить большую часть ошибочных последовательностей и существенно снизить искусственное разнообразие клонального репертуара [13]. Дальнейшую биоинформатическую обработку результатов проводили с помощью языка программирования R [14].

Ассоциацию обнаруженных клонотипов с тем или иным фенотипом Т-лимфоцитов осуществляли по совпадению нуклеотидной последовательности участка CDR3 и V-сегмента ТКР между репертуарами выделенных фракций Т-клеток.

### Использованные опубликованные массивы секвенирования кДНК бета-цепей ТКР

В работе были использованы опубликованные данные, полученные при секвенировании репертуаров кДНК бета-цепей ТКР периферической крови и синовиальной жидкости HLA-B\*27<sup>+</sup>-больных анкилозирующим спондилитом (данные доступны в публичной базе данных NCBI SRA по идентификатору SRP111372) [4]. Все использованные в работе опубликованные данные секвенирования были обработаны так же, как данные секвенирования, полученные для настоящей работы.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Характеристика исследованных образцов клеток и технологии реконструкции клонального репертуара

Для анализа клонального репертуара из периферической крови пациента с клинически установленным диагнозом «анкилозирующий спондилит» с помощью проточного цитофлуориметра были выделены 50 000 клеток, экспрессирующих маркеры CD3, CD38 и HLA-DR. На момент получения образцов крови состояние пациента характеризовалось выраженной болезненностью и ограниченной подвижностью пораженных суставов; антицитокиновая терапия не проводилась. По результатам цитофлуориметрии 2,6 % Т-лимфоцитов имели фенотип CD3<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, 1,5 % — CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>. Приведенные значения соответствовали опубликованным данным для периферической крови здоровых доноров того же возраста [15]. Повышенная представленность была отмечена для субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов: 39,2 % у пациента в сравнении с 5,8–24,6 % у здоровых доноров того же возраста.

В тот же момент времени из периферической крови донора были выделены клетки субпопуляций цитотоксических (CD4<sup>+</sup>) и хелперных (CD8<sup>+</sup>) Т-лимфоцитов, а также два образца клеток мононуклеарной фракции крови без дополнительного фракционирования (F1 и F2).

Для реконструкции клональных репертуаров бета-цепей Т-клеточного рецептора (ТКР) собранных образцов клеток мы применили оригинальную технологию, которая включала:

1) применение эффекта «смены матрицы» при синтезе кДНК, что позволяет использовать универсальные праймеры и исключить неравномерную амплификацию последовательностей ТКР, возникающую из-за различий в структуре входящего в состав зрелого гена ТКР переменного сегмента (V-сегмента);

2) применение технологии молекулярного баркодирования [8], что позволяет количественно оценить глубину анализа репертуара Т-лимфоцитов и представленность каждого клона Т-лимфоцитов в исследуемом образце [9], а также, в ходе предварительной обработки результатов секвенирования, скорректировать ошибки чтения и существенно снизить искусственное разнообразие клонального репертуара, возникающее в результате таких ошибок [11];

3) введение образец-специфических последовательностей (баркодов) на оба конца молекул кДНК библиотеки, одна из которых вводится на этапе синтеза кДНК [10], что позволяет практически полностью исключить кросс-контаминацию образцов как в процессе пробоподготовки, так и в процессе секвенирования. Низкая вероятность кросс-контаминации в свою очередь позволяет ассоциировать выявляемые клонотипы с определенным фенотипом Т-лимфоцитов, основываясь на идентификации уникальной нуклеотидной последовательности переменной части ТКР в образцах различных фракций Т-клеток (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, F1 и F2, CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>).

После подготовки и секвенирования соответствующих библиотек кДНК бета-цепей ТКР для собранных образцов клеток было получено 20,25 млн прочтений: 6,23 и 7,53 млн для образцов F1 и F2 соответственно, 2,78 млн — для CD4<sup>+</sup>, 2,96 млн — для CD8<sup>+</sup> и 0,75 млн — для CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-фракций Т-лимфоцитов. При дальнейшей обработке и реконструкции последовательностей переменной части бета-цепей ТКР (определении нуклеотидной последовательности CDR3 и V-сегмента — идентификации Т-клеточного клонотипа) использовали последовательности кДНК, прочитанные не менее двух раз, что позволяло дополнительно снизить искусственное разнообразие репертуара, возникающее из-за идентифицируемых в образце ошибочных клонотипов [13, 16].

Общая глубина анализа клонального репертуара Т-лимфоцитов периферической крови пациента составила около 1,6 млн уникальных клонотипов. Для образцов F1, F2, CD4 и CD8 было проанализировано 3,3 млн отдельных молекул кДНК бета-цепей ТКР (969 000, 1 260 000, 601 000 и 652 000 соответственно). В соответствии с ранее опубликованной оценкой эффективности использованной технологии реконструкции репертуара общая глубина анализа составила около 3,3 млн Т-клеток [13, 16]. Массив результатов секвенирования для фракции CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> содержал 17 296 последовательностей кДНК бета-цепей ТКР, прочитанных минимум дважды, тогда как количество клеток фракции составило 50 000. Таким образом, в среднем, каждая последовательность кДНК ТКР, попавшая в анализ, представляла мРНК ТКР отдельного Т-лимфоцита, и общая глубина анализа фракции активированных Т-лимфоцитов составила около 17 000 Т-клеток.

### Анализ представленности клонотипов фракции активированных Т-лимфоцитов в общем репертуаре Т-клеток

На первом этапе анализа клонального репертуара фракции активированных Т-лимфоцитов мы исследовали распределение обнаруженных клонотипов в общем

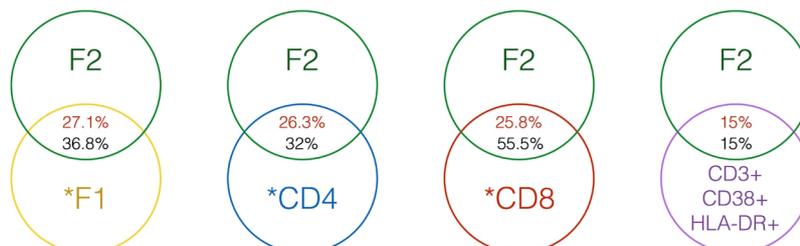
**Таблица 1.** Сопоставление клонального состава фракции CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов с образцами полного репертуара Т-клеток периферической крови

Ассоциированный фенотип*	Найдены в обеих репликах (образцы F1 и F2)**	Найдены только в одной из реплик (образец F1 или F2)**	Не обнаружены ни в одной из реплик***
CD4	505 (4,2 %)	148 (1,2 %)	119 (1 %)
CD8	282 (2,4 %)	29 (0,2 %)	32 (0,3 %)
Не определен	175 (1,5 %)	425 (3,6 %)	10212 (85,6 %)

**Примечание.** \* — принадлежность к фракции цитотоксических или хелперных Т-клеток по результатам анализа репертуаров образцов CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>; \*\* — в скобках указана доля от общего клонального разнообразия фракции; \*\*\* — число клонотипов, детектированных только во фракции CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>DR<sup>+</sup>.

репертуаре Т-клеток периферической крови пациента. Более 85 % (10 212 из 11 927) клонотипов фракции активированных Т-клеток не были обнаружены ни в одном из репертуаров не фракционированных Т-клеток (F1 и F2) или фракций цитотоксических или хелперных Т-лимфоцитов (табл. 1). Вероятность обнаружения клонотипа в образце пропорциональна численности клона Т-лимфоцитов с таким ТКР в общем пуле Т-клеток периферической крови (т. е. представленности клонотипа в репертуаре). Высокое разнообразие и различная представленность клонов репертуара Т-клеток при сравнительно небольшом объеме исследуемого образца может объяснять значительную долю несовпадающих клонотипов между независимыми образцами Т-клеток, полученными в один момент времени.

Современная оценка теоретического разнообразия репертуара бета-цепей ТКР составляет порядка  $10^8$  вариантов [17], а диапазон представленности клонотипов в образцах полного репертуара, исследованных в нашей работе, составляет 1,5 % —  $8,6 \times 10^{-6}$  % Т-клеток периферической крови. Чтобы определить, являлась ли наблюдаемая степень соответствия полному репертуару характерной именно для репертуара фракции CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>, мы проанализировали степень совпадения клонального состава образцов полного репертуара (F1) и отдельных фракций Т-клеток, выделенных на основе экспрессии других поверхностных маркеров (CD4 и CD8), с образцом F2. При этом, для соответствия глубине анализа фракции активированных Т-лимфоцитов, репертуары образцов F1, CD4 и CD8 были восстановлены на основе соответствующего числа случайно отобранных *in silico* молекул кДНК ТКР (репертуары \*F1, \*CD4 и \*CD8). После 100 независимых раундов такого анализа около 30 % клонотипов для каждого репертуара совпадали с клонотипами в образце F2 и представляли при этом 30–50 % от общего числа Т-клеток репертуаров \*F1, \*CD4 и \*CD8. Соответствующие показатели для репертуара фракции CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-клеток оказались в два раза ниже (рис. 1). Это свидетельствует о существенном обогащении фракции CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов клонами Т-клеток, представленность которых в полном репертуаре недостаточна для обнаружения в идентичном по объему независимом образце Т-клеток.



**Рис. 1.** Анализ сходства клонального состава различных фракций Т-лимфоцитов донора. Красным цветом указана доля клонального разнообразия, черным — доля репертуара Т-клеток, занимаемого клонотипами, совпадающими между сравниваемыми массивами. \*F1, \*CD4, \*CD8 — репертуары образцов F1, CD4, CD8, восстановленные на основе 17 523 случайно отобранных *in silico* молекул кДНК ТКР, что равно числу молекул кДНК ТКР, попавших в анализ для образца фракции CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>

Чуть более 1 500 клонотипов репертуара фракции активированных Т-лимфоцитов (13,1 % от клонального разнообразия и около 20 % от числа проанализированных Т-клеток фракции) были обнаружены хотя бы в одном из двух независимых образцов не фракционированных Т-лимфоцитов периферической крови (F1 и F2) при достигнутой глубине анализа полного репертуара в 2 млн Т-клеток. Суммарно доля Т-клеток периферической крови, представленных такими клонотипами, составила 8,5 %. При этом лишь часть из них составляли клонотипы с относительно высокой представленностью в общем репертуаре Т-лимфоцитов пациента (рис. 2). Так, из 100 наиболее высокопредставленных в общем репертуаре клонотипов только 45 были обнаружены в репертуаре CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов (39 и 6 клонотипов фракций цитотоксических и хелперных Т-лимфоцитов соответственно).

Анализ степени совпадения клонального состава исследованных образцов показал, что основная часть фракции CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов как по клональному разнообразию, так и по числу Т-клеток фракции была представлена клонами, имевшими низкую численность в общем пуле Т-лимфоцитов пациента. Низкая численность около 90 % клонотипов фракции обуславливает невозможность обнаружения таких клонотипов в образцах не фракционированных периферических Т-клеток при обычной глубине анализа в несколько миллионов отдельных Т-клеток периферической крови.

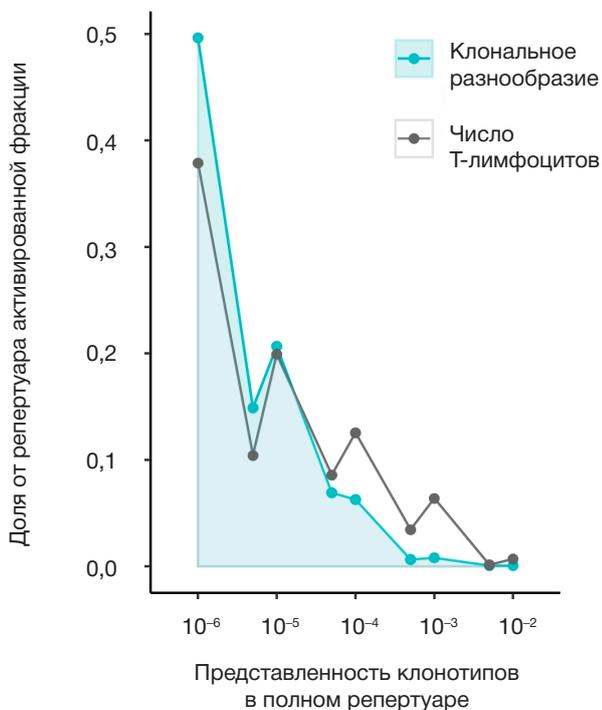
### Структура клонального состава фракции CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов

Полная структура варибельного домена бета-цепи ТКР целиком или в значительной степени определяет специфичность клона Т-лимфоцитов в отношении распознаваемого антигена в контексте определенной молекулы главного комплекса гистосовместимости (main histocompatibility complex, MHC) [18–20]. При анализе клонального репертуара фракции активированных Т-лимфоцитов каждый клонотип был представлен как комбинация аминокислотной последовательности гиперварибельного участка CDR3 и идентификатора V-сегмента, входящего в состав зрелого

гена ТКР и определяющего структуру остальной части вариабельного домена бета-цепи.

Клональный репертуар фракции активированных Т-лимфоцитов пациента характеризовался высоким относительным разнообразием, сопоставимым с разнообразием полного репертуара. В соответствии с результатами секвенирования практически каждая Т-клетка фракции, попавшая в анализ, представляла уникальный вариант вариабельного домена бета-цепи ТКР: из 17 000 отдельных молекул кДНК ТКР было восстановлено порядка 12 000 отдельных клонотипов. Для сравнения: в каждом из образцов тотальной фракции Т-лимфоцитов (F1 и F2) из 1 млн последовательностей отдельных молекул кДНК ТКР было идентифицировано около 550 000 отдельных клонотипов.

Распределение представленности клонотипов фракции  $CD3^+CD38^+HLA-DR^+$  также совпадало с распределением полного репертуара Т-клеток (образец F1). Наиболее высокопредставленный клонотип фракции занимал 0,27 % от общего числа Т-лимфоцитов. Для сравнения: наиболее высокопредставленный клонотип полного репертуара (F1) представлял 1,6 % Т-клеток репертуара. На 100 наиболее высокопредставленных клонотипов образцов  $CD3^+CD38^+HLA-DR^+$  и F1 пришлось 5,6 и 9 % Т-клеток репертуара соответственно. Также не было обнаружено существенных различий между образцами F1 и  $CD3^+CD38^+HLA-DR^+$  в распределении представленности групп клонотипов, в состав бета-цепи ТКР которых входит определенный V-сегмент и которые, таким образом, представляют собой клонотипы, предположительно распознающие пептиды в комплексе со сходными молекулами МНС. Полученные результаты демонстрируют отсутствие во фракции активированных Т-клеток периферической крови пациента значительного по сравнению с полным репертуаром обогащения клонотипами с определенной структурой вариабельного домена бета-цепи ТКР.



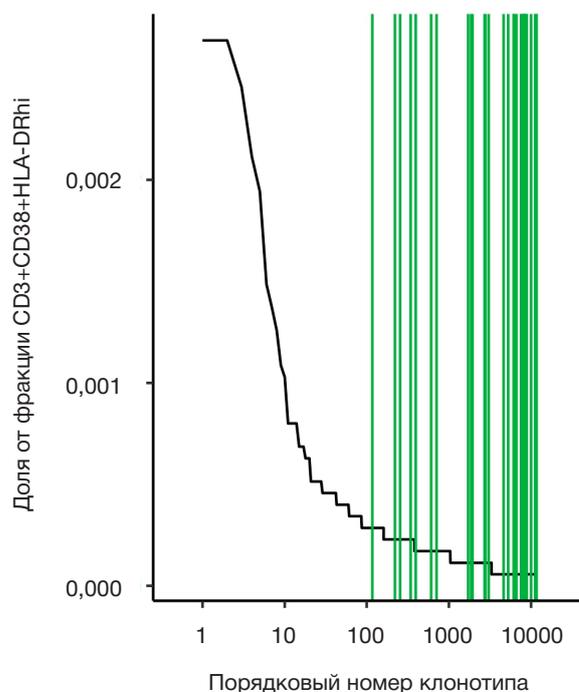
**Рис. 2.** Распределение доли клонотипов, идентифицированных во фракции  $CD3^+CD38^+HLA-DR^+$ -Т-клеток, в зависимости от представленности клонотипа в полном репертуаре (F1). Ось Y — доля клонотипов фракции от общего числа клонотипов фракции, ось X — представленность клонотипа в полном репертуаре Т-клеток

### Поиск клонотипов, ассоциированных с развитием анкилозирующего спондилита

Непосредственное участие в иммунном ответе клеток, экспрессирующих маркеры Т-клеточной активации, позволяет предполагать обогащение репертуара активированной фракции клонотипами, которые связаны с развитием воспаления в период обострения АС. Для характеристики репертуара Т-клеток фракции  $CD3^+CD38^+HLA-DR^+$  мы провели поиск ассоциированных с АС клонотипов, обнаруженных ранее в периферической крови и синовиальной жидкости  $HLA-B^*27$ -положительных пациентов [3, 4]. В массив для поиска были также добавлены клонотипы, обнаруженные в синовиальной жидкости (СЖ) минимум двух из трех  $HLA-B^*27$ -позитивных пациентов, репертуары которых были исследованы нами ранее [4]. Такое ограничение было принято для снижения эффекта случайного совпадения нерелевантных клонотипов между двумя донорами и, таким образом, поиска клонотипов, специфически присутствующих в месте воспаления у разных доноров. Массив для поиска включал 1 913 клонотипов: 11 последовательностей CDR3, составляющих мотив, ассоциированный с АС по результатам двух упомянутых работ, а также 1 902 клонотипа, найденных в синовиальной жидкости больных АС.

Среди 11 927 клонотипов репертуара фракции активированных Т-лимфоцитов мы обнаружили 32 полных совпадения аминокислотной последовательности вариабельного домена бета-цепи ТКР с клонотипами из списка. Большинство совпавших между массивами клонотипов являлись сравнительно низкопредставленными во фракции  $CD3^+CD38^+HLA-DR^+$  Т-клеток (рис. 3).

Восемь из этих 32 клонотипов не были обнаружены в репертуарах Т-клеток периферической крови  $HLA-B^*27$ -позитивных здоровых доноров (данные из [4]) (табл. 2), что



**Рис. 3.** Представленность клонотипов из группы ассоциированных с АС и обнаруженных в синовиальной жидкости больных АС в репертуаре фракции активированных Т-клеток пациента. Ранг (порядковый номер) каждого из клонотипов списка (см. пояснения в тексте статьи), обнаруженных в репертуаре фракции, обозначен вертикальными линиями

предполагает отсутствие экспансии таких клонотипов у здоровых доноров [4, 21, 22]. Один из этих 8 клонотипов, TRBV9\_CASSVGVYSTDTQYF\_TRBJ2-3, входит в состав 11 вариантов последовательностей варибельной части ТКР, составляющих ассоциированный с АС мотив CDR3 бета-цепи ТКР, обнаруженный ранее также в синовиальной жидкости у *HLA-B\*27*-позитивных пациентов с реактивным артритом [5, 23]. Как и во всех трех ранее опубликованных случаях обнаружения данного клонотипа в образцах пациентов со спондилоартропатиями (АС, реактивный артрит (РеА)), в настоящей работе данный клонотип также был ассоциирован с субпопуляцией CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов.

Через 2 месяца, на протяжении которых состояние пациента не изменилось, мы провели повторный анализ клонального репертуара Т-лимфоцитов активированной фракции (временная точка 2). С помощью проточной цитофлуориметрии были собраны 16 000 и 10 500 клеток фракций CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> периферической крови, для которых было восстановлено 3 900 и 8 300 клонотипов бета-цепей ТКР соответственно. При сходной по числу выявленных клонотипов глубине анализа репертуара фракции активированных Т-клеток между двумя временными точками совпало около 3 % клонотипов, представлявших Т-лимфоциты цитотоксической и хелперной субпопуляций в равной пропорции: из 323 клонотипов, попавших в репертуар активированных Т-клеток в обеих временных точках, 154 были ассоциированы с фенотипом CD8<sup>+</sup>, 136 — с CD4<sup>+</sup> и для 33 фенотип не был определен.

В составе репертуара фракций CD8<sup>+</sup> активированных Т-лимфоцитов во второй временной точке вновь был обнаружен клонотип TRBV9\_CASSVGVYSTDTQYF\_TRBJ2-3, а также еще 3 клонотипа, обнаруженные ранее в синовиальной жидкости больных АС и не найденные в образцах периферической крови здоровых *HLA-B\*27*-позитивных доноров (табл. 2). Аминокислотная последовательность варибельного домена бета-цепи ТКР еще одного из обнаруженных в точке 2 клонотипов имела сравнительно высокую степень гомологии с опубликованными АС-ассоциированными клонотипами за счет идентичного V-сегмента в составе гена ТКР и сходной последовательности гиперварибельного участка CDR3. Данный клонотип был обнаружен в репертуаре периферической крови 40 % больных

АС (n = 25) [4] и двух из трех исследованных репертуаров Т-клеток синовиальной жидкости, но не был обнаружен ни в одном из образцов крови *HLA-B\*27*-позитивных здоровых доноров (n = 7) (табл. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поверхностные маркеры CD38 и HLA-DR позволяют выделить субпопуляцию Т-клеток, определяемых как активированные Т-лимфоциты и осуществляющих эффекторные функции при реализации иммунного ответа, например в ходе противовирусного ответа [24–27]. Повышенное число CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Т-клеток в периферической крови показано у пациентов с аутоиммунными воспалительными заболеваниями кишечника, которые часто регистрируют при различных спондилоартропатиях, включая анкилозирующий спондилит [28]. В недавнем исследовании эффекта антицитокиновой терапии было показано повышенное содержание цитотоксических HLA-DR<sup>+</sup>-Т-клеток в периферической крови больных АС по сравнению со здоровыми донорами, а также значимые различия по количеству HLA-DR<sup>+</sup> хелперных Т-клеток между пациентами, для которых терапия оказалась эффективной и неэффективной [29]. Обнаружение группы клонов Т-клеток с высокомолекулярной структурой ТКР, ассоциированных с АС [3, 4], определяет необходимость изучения клонального состава функционально различных субпопуляций Т-клеток при АС для выявления роли Т-лимфоцитов в развитии заболевания. В данной работе, используя одну из самых современных технологий подготовки библиотек кДНК и анализа данных секвенирования, мы впервые исследовали структуру и клональный состав репертуара субпопуляции активированных Т-лимфоцитов периферической крови при АС. Важными для данного исследования особенностями метода являются низкая вероятность искажений клонального состава и возможность количественной оценки представленности каждого выявленного клонотипа в образце.

Анализ представленности клонотипов фракции активированных Т-клеток в полном репертуаре Т-лимфоцитов периферической крови показал уникальность клонального состава фракции: субпопуляция активированных Т-лимфоцитов обогащена клонотипами, не попадающими в

**Таблица 2.** Анализ встречаемости клонотипов фракции CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов периферической крови пациента в образцах периферической крови и синовиальной жидкости (СЖ) пациентов с АС\*

Аминокислотная последовательность	V-сегмент	Частота встречаемости в образцах пациентов с АС** (n = 25), %	Число образцов СЖ (n = 3)	Ассоциированный фенотип***	Образец
CASSLGPQSYEQYF	TRBV5-1	32,0 (8)**	3	CD4	Точка 1
CASSVGVYSTDTQYF	TRBV9	24,0 (6)	1	CD8	Точки 1 и 2 (CD8 <sup>+</sup> )
CASSSRGPYEQYF	TRBV7-2	16,0 (4)	2	–	Точка 1
CASSDYNEQFF	TRBV2	16,0 (4)	2	CD4	Точка 1
CASSQEGQESDTQYF	TRBV4-2	12,0 (3)	2	–	Точка 1
CASSLGRNNEQFF	TRBV5-1	4,0 (1)	2	–	Точка 1
CAWSLGVNQPQHF	TRBV30	4,0 (1)	2	–	Точка 1
CASSYSGSGYTF	TRBV6-5	0 (0)	2	CD4	Точка 1
CASSVGDYGYTF	TRBV9	40,0 (10)	2	CD8	Точка 2 (CD8 <sup>+</sup> )
CASSLGLSGANLTF	TRBV5-6	8,0 (2)	2	–	Точка 2 (CD8 <sup>+</sup> )
CASSQAGAYQEQYF	TRBV4-2	0 (0)	2	–	Точка 2 (CD8 <sup>+</sup> )

**Примечание.** \* — в список включены клонотипы фракции CD3<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>-Т-лимфоцитов периферической крови пациента, не обнаруженные в образцах крови здоровых *HLA-B\*27*-положительных доноров; \*\* — в скобках указано число образцов периферической крови пациентов, в которых был обнаружен клонотип; \*\*\* — принадлежность к фракции цитотоксических или хелперных Т-клеток по результатам анализа репертуаров образцов CD8<sup>+</sup> и CD4<sup>+</sup>.

анализ при исследовании не фракционированных образцов или отдельных субпопуляций CD8<sup>+</sup>- и CD4<sup>+</sup>-Т-клеток периферической крови вследствие низкой численности клеток таких клонотипов. Значительная степень несовпадения клонального репертуара Т-клеток активированной фракции при сравнительном анализе образцов в двух временных точках, по-видимому, также является следствием малой представленности клонотипов фракции.

Низкая численность большинства клонотипов активированной фракции Т-клеток может быть связана с обогащением клетками, участвующими в воспалительной реакции и локализующимися, в большей степени, в очагах воспаления. Повышенная численность клеток АС-ассоциированных клонов в синовиальной жидкости по сравнению с периферической кровью при остром синовите у больных АС показана в недавней работе Komesh и соавт. [4]. Вместе с тем при достигнутой глубине анализа разнообразия клонального состава фракции практически совпадает с разнообразием полного репертуара Т-лимфоцитов периферической крови. Исследуя репертуар фракции, мы также не обнаружили выраженных клональных экспансий или обогащения клонотипами с определенной структурой варибельного домена бета-цепи ТКР по сравнению с полным репертуаром. С использованием недавно созданной базы данных клонотипов с охарактеризованной специфичностью к различным комплексам МНС–пептид [30] среди клонотипов активированной фракции было обнаружено несколько совпадений аминокислотной последовательности бета-цепи ТКР с клонотипами, специфичными к иммуногенным пептидам вирусов гриппа, CMV и EBV. Можно заключить, что обнаруженные в периферической крови пациента с АС Т-лимфоциты, экспрессирующие маркеры активации HLA-DR и CD38, представляют фракцию активно участвующих в иммунном ответе Т-клеток, специфичных к широкому кругу антигенов.

Для поиска клонотипов, связанных с АС, мы использовали данные о составе клонального репертуара Т-клеток периферической крови и синовиальной жидкости больных АС и периферической крови здоровых HLA-B\*27-позитивных доноров, полученные ранее с использованием той же технологии реконструкции Т-клеточного репертуара. После анализа репертуаров двух полученных в разное время и с помощью разных стратегий цитофлуориметрии образцов Т-клеток, экспрессирующих маркеры активации, нами были найдены 11 клонотипов, не обнаруженные ни в одном из репертуаров здоровых доноров и при этом идентифицированные в синовиальной жидкости минимум двух больных АС. Девять из них были обнаружены также и в репертуарах периферической крови больных. Идентификация данных клонотипов в репертуарах HLA-B\*27<sup>+</sup>-пациентов с АС и отсутствие их у здоровых HLA-B\*27<sup>+</sup>-доноров демонстрирует способность прохождения такими клонотипами селекции в тимусе при наличии HLA-B\*27, с последующей клональной экспансией у пациентов, и отсутствие соответствующих клональных экспансий у здоровых HLA-B\*27<sup>+</sup>-индивидов [21].

Среди указанных 11 последовательностей варибельного домена бета-цепи ТКР был обнаружен клонотип TRBV9\_CASSVGVYSTDTQYF\_TRBJ2-3, ассоциированный с АС по результатам недавних работ по анализу клонального репертуара Т-клеток периферической крови [3] и си-

новиальной жидкости [4] больных АС. Ранее идентичный клонотип бета-цепи ТКР был обнаружен в синовиальной жидкости HLA-B\*27<sup>+</sup>-пациентов с реактивным артритом [5, 23]. Как и в настоящей работе, во всех процитированных исследованиях данный клонотип ассоциирован с субпопуляцией цитотоксических Т-лимфоцитов. Проанализировав клональный репертуар двух независимых образцов фракции активированных Т-лимфоцитов периферической крови, полученных с разницей в 2 месяца с использованием разных стратегий выделения клеточных субпопуляций, нам удалось показать длительное присутствие Т-клеток данного клонотипа в активированном состоянии в периферической крови пациента.

Также в составе фракции цитотоксических активированных Т-лимфоцитов нами был обнаружен клонотип TRBV9\_CASSVGGDYGYTF\_TRBJ1-2, найденный в образцах периферической крови 40 % больных (n = 25) и двух образцах синовиальной жидкости пациентов (n = 3). Высокая частота обнаружения в крови и синовиальной жидкости больных АС, определенная степень гомологии структуры варибельного домена бета-цепи ТКР данного клонотипа с другими, ранее обнаруженными у больных РеА и АС клонотипами, и отсутствие в образцах периферической крови здоровых HLA-B\*27<sup>+</sup>-доноров позволяют предположить возможную связь данного клонотипа с воспалительными процессами при анкилозирующем спондилите. Кроме того, по-видимому, некоторые клонотипы фракции хелперных Т-клеток, также могут быть связаны с АС, о чем говорит обнаружение в репертуаре активированных Т-клеток нескольких CD4<sup>+</sup>-клонотипов с совпадающей структурой варибельного домена бета-цепи ТКР с клонотипами CD4<sup>+</sup>-фракций Т-клеток синовиальной жидкости больных АС и не обнаруженных в периферической крови здоровых HLA-B\*27<sup>+</sup>-доноров.

## ВЫВОДЫ

В нашем исследовании впервые изучен клональный состав фракции Т-лимфоцитов, экспрессирующих маркеры активации HLA-DR и CD38, периферической крови пациента с анкилозирующим спондилитом. Показано обогащение фракции малочисленными в общем репертуаре Т-клеток клонотипами и отсутствие выраженной олигоклональности субпопуляции на фоне активной стадии заболевания. В составе репертуара фракции обнаружен ряд клонотипов субпопуляций цитотоксических и хелперных Т-клеток, вероятно, связанных с воспалительной реакцией при АС. Наиболее значительным результатом, по мнению авторов, является обнаружение в субпопуляции активированных цитотоксических Т-лимфоцитов крови клонотипа, ассоциированного с АС по результатам более ранних исследований. Экспрессия маркеров активации клетками ассоциированных с АС клонотипов демонстрирует активное участие таких клонов Т-клеток в воспалительной реакции. Дальнейшие исследования, направленные на изучение клонального состава функционально различных субпопуляций Т-клеток и определение антигенной специфичности выявленных клонотипов, позволят глубже понять механизмы возникновения и развития АС и разработать способы специфической терапии данного заболевания.

## Литература

- Brown MA, Kenna T, Wordsworth BP. Genetics of ankylosing spondylitis — insights into pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Feb; 12 (2): 81–91. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.133.
- Benjamin R, Parham P. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today*. 1990 Apr; 11 (4): 137–42.
- Faham M, Carlton V, Moorhead M, Zheng J, Klinger M, Pepin F et al. Discovery of T-Cell Receptor Beta Motifs Specific to HLA-B27(+) Ankylosing Spondylitis by Deep Repertoire Sequence Analysis. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Apr; 69 (4): 774–84. DOI: 10.1002/art.40028.
- Komech EA, Pogorelyy MV, Egorov ES, Britanova OV, Rebrikov DV, Bochkova AG et al. CD8+ T cells with characteristic TCR beta motif are detected in blood and expanded in synovial fluid of ankylosing spondylitis patients. *Rheumatology (Oxford)*. Forthcoming 2018.
- Duchmann R, May E, Ackermann B, Goergen B, Meyer zum Büschenfelde KH, Märker-Hermann E. HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to arthritogenic enterobacteria or self-antigens are dominated by closely related TCRBV gene segments. A study in patients with reactive arthritis. *Scand J Immunol*. 1996 Jan; 43 (1): 101–8.
- Dulphy N, Peyrat MA, Tieng V, Douay C, Rabian C, Tamouza R et al. Common intra-articular T cell expansions in patients with reactive arthritis: identical beta-chain junctional sequences and cytotoxicity toward HLA-B27. *J Immunol*. 1999 Apr 1; 162 (7): 3830–9.
- May E, Dulphy N, Frauendorf E, Duchmann R, Bowness P, Lopez de Castro JA et al. Conserved TCR beta chain usage in reactive arthritis; evidence for selection by a putative HLA-B27-associated autoantigen. *Tissue Antigens*. 2002 Oct; 60 (4): 299–308.
- Kivioja T, Vähärautio A, Karlsson K, Bonke M, Enge M, Linnarsson S et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods*. 2011 Nov 20; 9 (11): 72–4. DOI: 10.1038/nmeth.1778.
- Mamedov IZ, Britanova OV, Zvyagin IV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Putintseva EV et al. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front Immunol*. 2013; 4: 456. Published online 2013 Dec 23. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00456.
- Zvyagin IV, Mamedov IZ, Tatarinova OV, Komech EA, Kurnikova EE, Boyakova EV et al. Tracking T-cell immune reconstitution after TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted hematopoietic cells transplantation in children. *Leukemia*. 2017; (31): 1145–53. DOI: 10.1038/leu.2016.321.
- 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. Epub 2014 May 4.
- 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.
- Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol*. 2014 Mar 15; 192 (6): 2689–98. DOI: 10.4049/jimmunol.1302064.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2014. Available from: <http://www.r-project.org/>.
- Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol*. 2004 Mar; 72 (3): 203–12. DOI: 10.1046/j.0902-4441.2003.00199.x.
- Egorov ES, Merzlyak EM, Shelenkov AA, Britanova OV, Sharonov GV, Staroverov DB et al. Quantitative Profiling of Immune Repertoires for Minor Lymphocyte Counts Using Unique Molecular Identifiers. *J Immunol*. 2015 Jun 15; 194 (12): 6155–63. DOI: 10.1049/jimmunol.1500215.
- Qi Q, Liu Y, Cheng Y, Glanville J, Zhang D, Lee JY et al. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Sep 9; 111 (36): 13139–44. DOI: 10.1073/pnas.1409155111.
- Koning D, Costa AI, Hoof I, Miles JJ, Nanlohy NM, Ladell K et al. CD8+ TCR repertoire formation is guided primarily by the peptide component of the antigenic complex. *J Immunol*. 2013 Feb 1; 190 (3): 931–9. DOI: 10.4049/jimmunol.1202466.
- Birnbaum ME, Mendoza JL, Sethi DK, Dong S, Glanville J, Dobbins J et al. Deconstructing the Peptide-MHC Specificity of T Cell Recognition. *Cell*. 2014 May 22; 157 (5): 1073–87. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.047.
- Zvyagin IV, Pogorelyy MV, Ivanova ME, Komech EA, Shugay M, Bolotin DA et al. Distinctive properties of identical twins' TCR repertoires revealed by high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 22; 111 (16): 5980–5. DOI: 10.1073/pnas.1319389111.
- Elhanati Y, Murugan A, Callan CG, Mora T, Walczak AM. Quantifying selection in immune receptor repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul 8; 111 (27): 9875–80. DOI: 10.1073/pnas.1409572111.
- Pogorelyy MV, Minervina AA, Chudakov DM, Mamedov IZ, Lebedev YB, Mora T et al. Method for identification of condition-associated public antigen receptor sequences. *BioRxiv* 195057. DOI: 10.1101/195057.
- Dulphy N, Peyrat MA, Tieng V, Douay C, Rabian C, Tamouza R et al. Common intra-articular T cell expansions in patients with reactive arthritis: identical beta-chain junctional sequences and cytotoxicity toward HLA-B27. *J Immunol*. 1999 Apr 1; 162 (7): 3830–39.
- Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *J Immunol*. 2009 Dec 15; 183 (12): 7919–30. DOI: 10.4049/jimmunol.08039003.
- Meditz AL, Haas MK, Folkvord JM, Melander K, Young R, McCarter M et al. HLA-DR+ CD38+ CD4+ T Lymphocytes Have Elevated CCR5 Expression and Produce the Majority of R5-Tropic HIV-1 RNA In Vivo. *J Virol*. 2011 Oct; 85 (19): 10189–200. DOI: 10.1128/JVI.02529-10. Epub 2011 Aug 3.
- Blom K, Braun M, Ivarsson MA, Gonzalez VD, Falconer K, Moll M et al. Temporal dynamics of the primary human T cell response to yellow fever virus 17D as it matures from an effector- to a memory-type response. *J Immunol*. 2013 Mar 1; 190 (5): 2150–8. DOI: 10.4049/jimmunol.1202234.
- Blom K, Braun M, Pakalniene J, Dailidyte L, Béziat V, Lampen MH et al. Specificity and dynamics of effector and memory CD8 T cell responses in human tick-borne encephalitis virus infection. *PLoS Pathog*. 2015 Jan 22; 11 (1): e1004622. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004622.
- Funderburg NT, Stubblefield Park SR, Sung HC, Hardy G, Clagett B, Ignatz-Hoover J et al. Circulating CD4(+) and CD8(+) T cells are activated in inflammatory bowel disease and are associated with plasma markers of inflammation. *Immunology*. 2013 Sep; 140 (1): 87–97. DOI: 10.1111/imm.12114.
- Dulic S, Vasarhelyi Z, Bajnok A, Szalay B, Toldi G, Kovacs L et al. The Impact of Anti-TNF Therapy on CD4+ and CD8+ Cell Subsets in Ankylosing Spondylitis. *Pathobiology*. 2017 Dec 6. DOI: 10.1159/000484250. [Epub ahead of print.]
- 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*. 2018 Jan 4; 46 (D1): D419–D427. DOI: 10.1093/nar/gkx760.

## References

- Brown MA, Kenna T, Wordsworth BP. Genetics of ankylosing spondylitis — insights into pathogenesis. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Feb; 12 (2): 81–91. DOI: 10.1038/nrrheum.2015.133.
- Benjamin R, Parham P. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today*. 1990 Apr; 11 (4): 137–42.
- Faham M, Carlton V, Moorhead M, Zheng J, Klinger M, Pepin F et al. Discovery of T-Cell Receptor Beta Motifs Specific to HLA-B27(+) Ankylosing Spondylitis by Deep Repertoire Sequence Analysis. *Arthritis Rheumatol*. 2017 Apr; 69 (4): 774–84. DOI: 10.1002/art.40028.
- Komech EA, Pogorelyy MV, Egorov ES, Britanova OV, Rebrikov DV, Bochkova AG et al. CD8+ T cells with characteristic TCR beta motif are detected in blood and expanded in synovial fluid of ankylosing spondylitis patients. *Rheumatology (Oxford)*. Forthcoming 2018.
- Duchmann R, May E, Ackermann B, Goergen B, Meyer zum Büschenfelde KH, Märker-Hermann E. HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to arthritogenic enterobacteria or self-antigens are dominated by closely related TCRBV gene segments. A study in patients with reactive arthritis. *Scand J Immunol*. 1996 Jan; 43 (1): 101–8.
- Dulphy N, Peyrat MA, Tieng V, Douay C, Rabian C, Tamouza R et al. Common intra-articular T cell expansions in patients with reactive arthritis: identical beta-chain junctional sequences and cytotoxicity toward HLA-B27. *J Immunol*. 1999 Apr 1; 162 (7): 3830–9.
- May E, Dulphy N, Frauendorf E, Duchmann R, Bowness P, Lopez de Castro JA et al. Conserved TCR beta chain usage in reactive arthritis; evidence for selection by a putative HLA-B27-associated autoantigen. *Tissue Antigens*. 2002 Oct; 60 (4): 299–308.
- Kivioja T, Vähärautio A, Karlsson K, Bonke M, Enge M, Linnarsson S et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods*. 2011 Nov 20; 9 (1): 72–4. DOI: 10.1038/nmeth.1778.
- Mamedov IZ, Britanova OV, Zvyagin IV, Turchaninova MA, Bolotin DA, Putintseva EV et al. Preparing unbiased T-cell receptor and antibody cDNA libraries for the deep next generation sequencing profiling. *Front Immunol*. 2013; 4: 456. Published online 2013 Dec 23. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00456.
- Zvyagin IV, Mamedov IZ, Tatarinova OV, Komech EA, Kurnikova EE, Boyakova EV et al. Tracking T-cell immune reconstitution after TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted hematopoietic cells transplantation in children. *Leukemia*. 2017; (31): 1145–53. DOI: 10.1038/leu.2016.321.
- 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. Epub 2014 May 4.
- 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.
- Britanova OV, Putintseva EV, Shugay M, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol*. 2014 Mar 15; 192 (6): 2689–98. DOI: 10.4049/jimmunol.1302064.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. 2014. Available from: <http://www.r-project.org/>.
- Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW. Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur J Haematol*. 2004 Mar; 72 (3): 203–12. DOI: 10.1046/j.0902-4441.2003.00199.x.
- Egorov ES, Merzlyak EM, Shelenkov AA, Britanova OV, Sharonov GV, Staroverov DB et al. Quantitative Profiling of Immune Repertoires for Minor Lymphocyte Counts Using Unique Molecular Identifiers. *J Immunol*. 2015 Jun 15; 194 (12): 6155–63. DOI: 10.1049/jimmunol.1500215.
- Qi Q, Liu Y, Cheng Y, Glanville J, Zhang D, Lee JY et al. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Sep 9; 111 (36): 13139–44. DOI: 10.1073/pnas.1409155111.
- Koning D, Costa AI, Hoof I, Miles JJ, Nanlohy NM, Ladell K et al. CD8+ TCR repertoire formation is guided primarily by the peptide component of the antigenic complex. *J Immunol*. 2013 Feb 1; 190 (3): 931–9. DOI: 10.4049/jimmunol.1202466.
- Birnbaum ME, Mendoza JL, Sethi DK, Dong S, Glanville J, Dobbins J et al. Deconstructing the Peptide-MHC Specificity of T Cell Recognition. *Cell*. 2014 May 22; 157 (5): 1073–87. DOI: 10.1016/j.cell.2014.03.047.
- Zvyagin IV, Pogorelyy MV, Ivanova ME, Komech EA, Shugay M, Bolotin DA et al. Distinctive properties of identical twins' TCR repertoires revealed by high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 22; 111 (16): 5980–5. DOI: 10.1073/pnas.1319389111.
- Elhanati Y, Murugan A, Callan CG, Mora T, Walczak AM. Quantifying selection in immune receptor repertoires. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jul 8; 111 (27): 9875–80. DOI: 10.1073/pnas.1409572111.
- Pogorelyy MV, Minervina AA, Chudakov DM, Mamedov IZ, Lebedev YB, Mora T et al. Method for identification of condition-associated public antigen receptor sequences. *BioRxiv* 195057. DOI: 10.1101/195057.
- Dulphy N, Peyrat MA, Tieng V, Douay C, Rabian C, Tamouza R et al. Common intra-articular T cell expansions in patients with reactive arthritis: identical beta-chain junctional sequences and cytotoxicity toward HLA-B27. *J Immunol*. 1999 Apr 1; 162 (7): 3830–9.
- Akondy RS, Monson ND, Miller JD, Edupuganti S, Teuwen D, Wu H et al. The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8+ T cell response. *J Immunol*. 2009 Dec 15; 183 (12): 7919–30. DOI: 10.4049/jimmunol.08039003.
- Meditz AL, Haas MK, Folkvord JM, Melander K, Young R, McCarter M et al. HLA-DR+ CD38+ CD4+ T Lymphocytes Have Elevated CCR5 Expression and Produce the Majority of R5-Tropic HIV-1 RNA In Vivo. *J Virol*. 2011 Oct; 85 (19): 10189–200. DOI: 10.1128/JVI.02529-10. Epub 2011 Aug 3.
- Blom K, Braun M, Ivarsson MA, Gonzalez VD, Falconer K, Moll M et al. Temporal dynamics of the primary human T cell response to yellow fever virus 17D as it matures from an effector- to a memory-type response. *J Immunol*. 2013 Mar 1; 190 (5): 2150–8. DOI: 10.4049/jimmunol.1202234.
- Blom K, Braun M, Pakalniene J, Dailidyte L, Béziat V, Lampen MH et al. Specificity and dynamics of effector and memory CD8 T cell responses in human tick-borne encephalitis virus infection. *PLoS Pathog*. 2015 Jan 22; 11 (1): e1004622. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004622.
- Funderburg NT, Stubblefield Park SR, Sung HC, Hardy G, Clagett B, Ignatz-Hoover J et al. Circulating CD4(+) and CD8(+) T cells are activated in inflammatory bowel disease and are associated with plasma markers of inflammation. *Immunology*. 2013 Sep; 140 (1): 87–97. DOI: 10.1111/imm.12114.
- Dulic S, Vasarhelyi Z, Bajnok A, Szalay B, Toldi G, Kovacs L et al. The Impact of Anti-TNF Therapy on CD4+ and CD8+ Cell Subsets in Ankylosing Spondylitis. *Pathobiology*. 2017 Dec 6. DOI: 10.1159/000484250. [Epub ahead of print.]
- 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*. 2018 Jan 4; 46 (D1): D419–D427. DOI: 10.1093/nar/gkx760.