

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 

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 


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⁺HLA-DR⁺ 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 высокомолекулярной 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 к настоящему времени 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 α (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/см³, «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 (FACS Vantage, 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⁺-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⁺HLA-DR⁺, 1,5 % — CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺. Приведенные значения соответствовали опубликованным данным для периферической крови здоровых доноров того же возраста [15]. Повышенная представленность была отмечена для субпопуляции CD3⁺CD38⁺-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⁺) и хелперных (CD8⁺) 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 варибельной части ТКР в образцах различных фракций Т-клеток (CD4⁺, CD8⁺, F1 и F2, CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺).

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⁺, 2,96 млн — для CD8⁺ и 0,75 млн — для CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺-фракций Т-лимфоцитов. При дальнейшей обработке и реконструкции последовательностей варибельной 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⁺CD38⁺HLA-DR⁺ 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⁺CD38⁺HLA-DR⁺-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⁺ и CD4⁺; ** — в скобках указана доля от общего клонального разнообразия фракции; *** — число клонотипов, детектированных только во фракции CD3⁺CD38⁺DR⁺.

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⁺CD38⁺HLA-DR⁺, 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⁺CD38⁺HLA-DR⁺-клеток оказались в два раза ниже (рис. 1). Это свидетельствует о существенном обогащении фракции CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺-Т-лимфоцитов клонами Т-клеток, представленность которых в полном репертуаре недостаточна для обнаружения в идентичном по объему независимом образце Т-клеток.

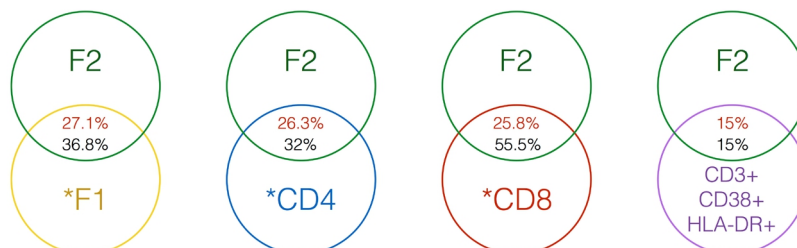


Рис. 1. Анализ сходства клонального состава различных фракций Т-лимфоцитов донора. Красным цветом указана доля клонального разнообразия, черным — доля репертуара Т-клеток, занимаемого клонотипами, совпадающими между сравниваемыми массивами. *F1, *CD4, *CD8 — репертуары образцов F1, CD4, CD8, восстановленные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

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⁺CD38⁺HLA-DR⁺-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⁺CD38⁺HLA-DR⁺-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⁺CD38⁺HLA-DR⁺-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.

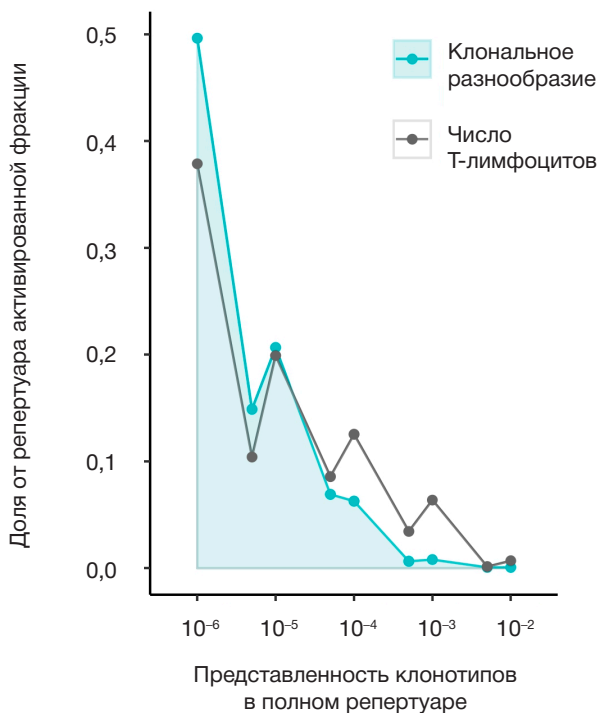


Рис. 2. Распределение доли клонотипов, идентифицированных во фракции CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺-Т-клеток, в зависимости от представленности клонотипа в полном репертуаре (F1). Ось Y — доля клонотипов фракции от общего числа клонотипов фракции, ось X — представленность клонотипа в полном репертуаре Т-клеток

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

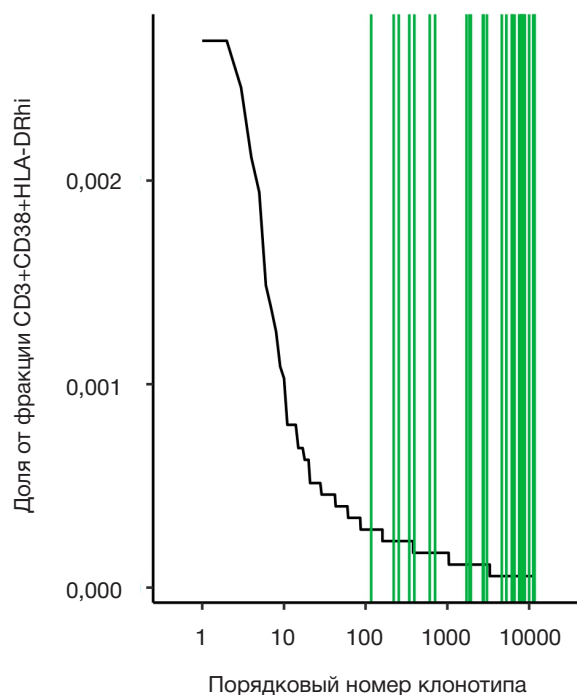


Рис. 3. Представленность клонотипов из группы ассоциированных с АС и обнаруженных в синовиальной жидкости больных АС в репертуаре фракции активированных Т-клеток пациента. Ранг (порядковый номер) каждого из клонотипов списка (см. пояснения в тексте статьи), обнаруженных в репертуаре фракции, обозначен 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⁺ 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⁺CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺ и CD3⁺CD8⁺CD38⁺HLA-DR⁺ 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⁺, 136 — с CD4⁺ и для 33 фенотип не был определен.

В составе репертуара фракций CD8⁺ 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 эффекторную функцию при реализации иммунного ответа, например в ходе противовирусного ответа [24–27]. Повышенное число CD38⁺HLA-DR⁺-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⁺-Т-клеток в периферической крови больных АС по сравнению со здоровыми донорами, а также значимые различия по количеству HLA-DR⁺ 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⁺CD38⁺HLA-DR⁺-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 ⁺)
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 ⁺)
CASSLGLSGANLTF	TRBV5-6	8,0 (2)	2	–	Точка 2 (CD8 ⁺)
CASSQAGAYQEQYF	TRBV4-2	0 (0)	2	–	Точка 2 (CD8 ⁺)

Примечание. * — в список включены клонотипы фракции CD3⁺CD38⁺HLA-DR⁺-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⁺ и CD4⁺.

анализ при исследовании не фракционированных образцов или отдельных субпопуляций CD8⁺- и CD4⁺-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⁺-пациентов с АС и отсутствие их у здоровых HLA-B*27⁺-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⁺-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⁺-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⁺-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⁺-клонотипов с совпадающей структурой варибельного домена бета-цепи ТКР с клонотипами CD4⁺-фракций Т-клеток синовиальной жидкости больных АС и не обнаруженных в периферической крови здоровых HLA-B*27⁺-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

1. 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.
2. Benjamin R, Parham P. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol Today*. 1990 Apr; 11 (4): 137–42.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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/>.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.]
30. 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.