

**Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова**

*На правах рукописи*



**Зорникова Ксения Викторовна**

**Динамика гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на  
вирус SARS-CoV-2**

3.2.7 –Иммунология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

**Москва**

**2023**

Работа выполнена в лаборатории Трансплантационной иммунологии ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научный руководитель** **Ефимов Григорий Александрович**  
кандидат биологических наук

**Официальные оппоненты** **Филатов Александр Васильевич**  
доктор биологических наук, профессор,  
заведующий лабораторией иммунохимии ФГБУ  
«Государственный научный центр Институт  
иммунологии» ФМБА России.

**Баклаушев Владимир Павлович**  
доктор медицинских наук, заместитель  
генерального директора по научной работе и  
медицинским технологиям ФГБУ  
«Федеральный научно-клинический центр  
специализированных видов медицинской  
помощи и медицинских технологий  
Федерального медико-биологического  
агентства».

**Британова Ольга Владимировна**  
кандидат биологических наук, старший  
научный сотрудник группы структурной  
организации Т-клеточного иммунитета ГНЦ  
ФГБУ Институт биоорганической химии им.  
академиков М.М. Шемякина и Ю.А.  
Овчинникова РАН.

Защита диссертации состоится 26 мая 2023г. в 17 ч 00 мин на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.1/2528>

Автореферат разослан 24 апреля 2023 г.,

Учёный секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Д.Б. Киселевский

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность и степень разработанности темы исследования**

Острая респираторная инфекция COVID-19, вызываемая вирусом SARS-CoV-2, является серьезным заболеванием, которое за несколько месяцев 2020 года распространилось по миру и привело к многочисленным человеческим жертвам, а также к тяжелым экономическому и социальному кризисам. Клинические проявления и иммунный ответ на вирус SARS-CoV-2 разнообразны, а течение болезни варьируется от полностью бессимптомного до летального. При этом стойкость иммунной защиты и вероятность повторного заражения все еще являются объектами пристального изучения, особенно в связи с появлением большого количества новых штаммов. Несмотря на то, что изначально наибольшее внимание было уделено гуморальному ответу, со временем было доказано, что Т-клетки также имеют важное значение для раннего контроля и успешного устранения вирусной инфекции (Swadling et al., 2022; Titov et al., 2022): участие CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток в иммунном ответе на SARS-CoV-2 уменьшает тяжесть заболевания (Liao et al., 2020; Rydyznski Moderbacher et al., 2020) и улучшает прогноз (Renner et al., 2021). Важным является не только наличие вирус-специфичных Т-клеток, но и то, какой Т-клеточный репертуар формируется в процессе иммунного ответа. Так снижение разнообразия Т-клеточных рецепторов характерно для более тяжелого течения заболевания (Liao et al., 2020; Wang et al., 2020a). Однако вопрос изменения репертуара со временем остается открытым. Изучение иммунного ответа на SARS-CoV-2 может внести вклад в создание различных систем тестирования на наличие иммунного ответа после болезни и в разработку наиболее эффективных вакцин. Помимо этого, изучение динамических изменений, происходящих в иммунной системе после столкновения с новым патогеном, может пролить свет на такие фундаментальные вопросы, как принципы формирования иммунологической памяти и эффективность иммунного ответа на изменчивый вирус.

**Целью** данной работы было изучение стойкости гуморального и клеточного иммунных ответов на SARS-CoV-2 и изменения репертуара Т-клеточных рецепторов (ТКР) на протяжении 8 месяцев после заболевания у людей, перенесших инфекцию COVID-19.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Оценка изменения уровня анти-RBD IgG антител и силы Т-клеточного ответа у людей, перенесших инфекцию COVID-19;
2. Оценка изменения частоты CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти, специфичных к иммуногенным эпитопам вируса SARS-CoV-2;
3. Анализ клонального состава эпитоп-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток памяти и характеристика репертуара Т-клеточных рецепторов;
4. Выявление основных характеристик Т-клеточного репертуара, влияющих на формирование долговременной Т-клеточной памяти.

#### **Научная новизна работы**

Впервые был произведен анализ динамики эпитоп-специфичного Т-клеточного иммунного ответа после перенесения инфекции COVID-19. Впервые получены последовательности  $\beta$  цепей Т-клеточных рецепторов и определены характеристики Т-клеточного репертуара, специфичного к иммуногенным эпитопам вируса SARS-CoV-2 (ALSKGVHFV, ALWEIQQVV, KCYGVSPTK, KTFPPTEPK, LLLDRLNQL, LLYDANYFL, MEVTPSGTWL, RLQSLQTYV, YLQPRTFLL). На примере этих эпитопов было продемонстрировано, что эпитоп-специфичные CD8 Т-клетки могут сохраняться в крови длительное время.

В работе впервые было показано, что сохранение иммунного ответа на SARS-CoV-2 в течение длительного времени зависит от клонального разнообразия первоначального ответа, а не от размера или публичности определенного клонотипа в периферической крови пациента.

## **Теоретическая и практическая значимость работы**

Представленные в диссертационной работе результаты имеют самостоятельный интерес не только для фундаментальных знаний о длительности иммунной защиты и принципах формирования долговременной Т-клеточной памяти, но и для практического применения.

В работе изучена длительность наличия анти-RBD IgG антител и Т-клеток, специфичных к белкам SARS-CoV-2. Понимание того, насколько стойким является иммунный ответ, может помочь в оценке вероятности повторного заражения, а также разработке наиболее эффективных стратегий вакцинации.

Полученные данные о иммунодоминантных эпитопах и о том, какие особенности Т-клеточных репертуаров способствуют формированию наиболее стойкого иммунного ответа, могут быть использованы для разработки вакцин нового поколения. Также эти данные можно использовать для изучения того, как иммунодоминантность эпитопов и характеристики Т-клеточного репертуара влияют на эволюцию вируса и его попытки избежать иммунного надзора.

Полученные в работе данные могут быть использованы для создания и улучшения систем тестирования на наличие иммунного ответа на болезнь, а также для определения промежутка времени после болезни, на котором результаты тестирования будут наиболее достоверными.

## **Методология и методы исследования**

Для изучения динамики адаптивного иммунного ответа на SARS-CoV-2 нами была собрана выборка людей, состоящая из 50 переболевших доноров (ПД). Также была сформирована контрольная группа, которая включала в себя 19 здоровых доноров (ЗД).

У каждого донора брали образцы периферической крови в двух временных точках: между 17 и 72 днем (медиана = 35) после начала заболевания (BT1) и между 180 и 292 днем (медиана = 242) после начала заболевания (BT2). Когорта доноров была протестирована на наличие IgG антител к RBD методом иммуноферментного анализа (ИФА) и Т-клеточного ответа на микс пептидов из

Мембранного (M), Нуклеокапсидного (N) и Шиповидного (S) белков SARS-CoV-2, который оценивался по продукции интерферона (IFN) методом ELISPOT. Одиннадцать здоровых доноров также были протестированы на наличие Т-клеточного ответа, результаты этих измерений были использованы для определения пороговых значений (Cut-off) по формуле:

$$\text{Cut-off} = \text{Среднее Значение} + 1,69 * \text{Стандартное Отклонение}$$

Для изучения Т-клеточного ответа на уровне индивидуальных эпитопов, были выбраны 15 эпитопов из различных белков SARS-CoV-2, презентруемых в нескольких распространенных аллелях HLA I. На основе HLA-типирования были отобраны 26 доноров. Лимфоциты периферической крови этих доноров были использованы для постановки *in vitro* антиген-специфичных экспансий, а процент эпитоп-специфичных CD8 Т-клеток детектировали цитометрически при помощи МНС-тетрамеров. Ответ на каждый эпитоп проверяли на 4 -15 донорах (медиана = 8,5). Количество лунок, в которых были обнаружены МНС-тетрамер+ клетки, было принято в качестве суррогатной характеристики частоты антиген-специфичных CD8+ Т-клеток памяти.

Для определения последовательностей  $\beta$ -цепей ТКР, МНС-тетрамер-положительные и МНС-тетрамер-отрицательны фракции клеток сортировались при помощи клеточного сортера. РНК-секвенирование библиотек ТКР осуществлялось по методу секвенирования нового поколения.

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Уровень анти-RBD-IgG-антител и количество Т-клеток, продуцирующих IFN $\gamma$  в ответ на стимуляцию белками SARS-CoV-2, снижаются через 8 месяцев после инфекции, однако Т-клеточный иммунный ответ сохраняется дольше, чем гуморальный.

2. Частота эпитоп-специфичных CD8+ Т-клеток в среднем снижается в 2.2 раза, однако клетки, распознающие иммунодоминантные эпитопы, продолжают персистировать в крови всех доноров как минимум в течение 8 месяцев после инфекции.

3. Высокая частота детекции ответ CD8+ Т-клеток на иммунодоминантные эпитопы обеспечивается за счет высокого разнообразия репертуара Т-клеточных рецепторов.

4. Длительность персистирования CD8+ Т-клеток памяти обеспечивается высоким клональным разнообразием, но не частотой и размером клонотипов.

#### **Личный вклад автора**

Основные результаты работы были получены автором или при его участии. Личный вклад автора заключается в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе полученных результатов, подготовке публикаций, написании текста диссертации. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

#### **Апробация результатов и публикации**

Результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на международной конференции 6th European Congress of Immunology, Белград, Сербия, 1-4 сентября 2021.

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ: 5 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 3.2.7 –Аллергология и иммунология, а также 1 тезисы.

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения результатов, выводов и списка литературы, который включает 170 источников. Работа изложена на 111 страницах, содержит 21 рисунок и 3 таблицы.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая часть работы была посвящена изучению стойкости антительного и Т-клеточного иммунных ответов на вирус SARS-CoV-2. В качестве материала для исследования использовали образцы крови и сыворотки здоровых добровольцев, перенесших COVID-19. У каждого добровольца образцы брались не позднее третьего месяца после начала заболевания (BT1) и после шестого месяца от начала заболевания (BT2). Были исследованы уровень анти-RBD IgG антител и количество клеток, продуцирующих IFN в ответ на стимуляцию пептидами из Шиповидного (S), Нуклеокапсидного (N) и Мембранного (M) белков вируса SARS-CoV-2. Также был исследован эпитоп-специфичный иммунный ответ CD8 Т-клеток на 15 иммуногенных эпитопов вируса (информация о пептидах приведена в таблице 1) и изменение частоты эпитоп-специфичных клеток в течении 8 месяцев после болезни.

**Таблица 1. Пептиды SARS-CoV-2, используемые в данном исследовании.**

#	Аминокислотная последовательность	Белок	Позиция	Аллель рестрикции	Связывание
1	<b>ALSKGVHFV</b>	ORF3a	72-80	A 02:01	0.1068
2	<b>ALWEIQQVV</b>	ORF1ab	4099-4107	A 02:01	0.0523
3	<b>ATSRTLSTYYK</b>	M	171-190	A 03:01	0.0566
4	<b>KCYGVSPTK</b>	S	378-386	A 03:01	0.9738
5	<b>KLWAQCVQL</b>	ORF1ab	27-35	A 02:01	0.1083
6	<b>KTFPPTEPK</b>	N	361-369	A 03:01	0.0548
7	<b>LLLDRLNQL</b>	N	222-230	A 02:01	0.1398
8	<b>LLLLDRLNQL</b>	N	221-230	A 02:01	1.1237
9	<b>LLYDANYFL</b>	ORF3a	139-147	A 02:01	0.0071
10	<b>MEVTPSGTWL</b>	N	322-331	B 40:01	0.1078
11	<b>NRFLYIIKL</b>	M	43-51	B 27:05	0.368
12	<b>QLRARSVSPK</b>	ORF7a	76-85	A 03:01	0.1639
13	<b>RLQSLQTYV</b>	S	1000-1008	A 02:01	0.1610
14	<b>SELVIGAVIL</b>	M	136-145	B 40:01	0.0713
15	<b>YLQPRTFLL</b>	S	269-277	A 02:01	0.0227

Связывание пептидов с HLA было предсказано алгоритмом NetMHCpan 4.1. M - Мембранный, N - Нуклеокапсидный, S - Шиповидный белки. Последовательность букв, используемая далее в качестве краткого названия, выделена жирным шрифтом

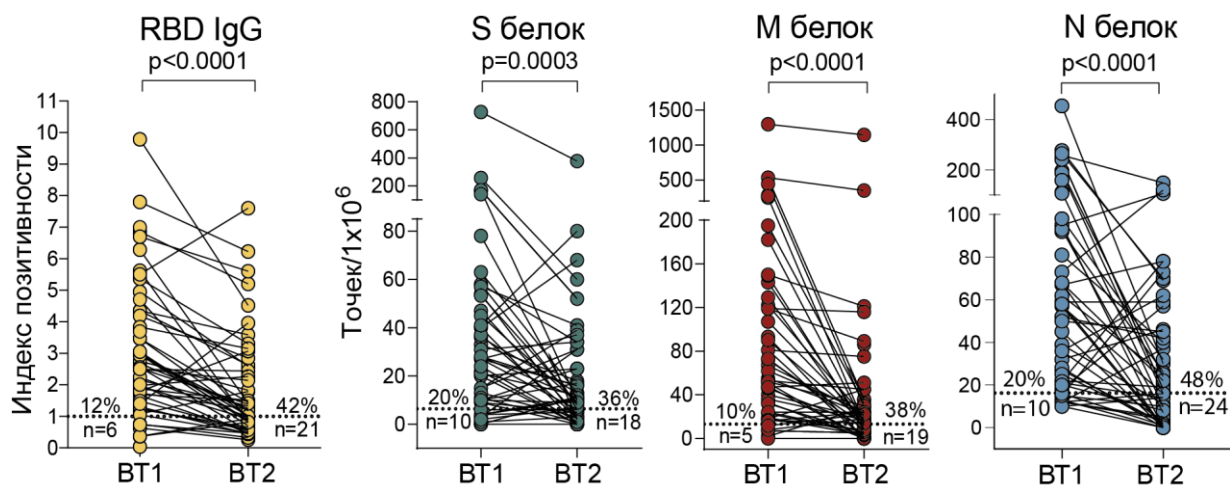


Во второй части работы был изучен репертуар Т-клеточных рецепторов, специфичных к 9 иммунодоминантным эпитомам. Для полученных последовательностей был проведен биоинформатический анализ их схожести, публичности, длины последовательности CDR3, частоты использования определенных V и J генов и вероятности V(D)J рекомбинации.

### **1. Клеточный иммунный ответ при COVID-19 развивается чаще и сохраняется дольше, чем гуморальный**

Первые работы по изучению иммунного ответа на вирус SARS-CoV-2 были посвящены гуморальному ответу (Tian et al., 2020; To et al., 2020), однако в скором времени было обнаружено, что Т-клетки также вносят немаловажный вклад в процесс элиминации SARS-CoV-2 (Grifoni et al., 2020; Swadling et al., 2022; Titov et al., 2022), уменьшая тяжесть заболевания (Liao et al., 2020; Rydyznski Moderbacher et al., 2020) и улучшая прогноз (Renner et al., 2021). Поскольку уровень повторных заражений тем же штаммом был крайне низким (Flacco et al., 2022), изучение длительности иммунной защиты стало важным вопросом при оценке рисков повторного заражения и сроков вакцинации.

При изучении уровня иммунной защиты у переболевших доноров было показано, что сразу после болезни уровень анти-RBD IgG антител был выше порогового значения у 44/50 доноров (88%, медиана индекса позитивности составила 2.51), также у большинства доноров Т-клетки продуцировали IFN в ответ на стимуляцию пептидами из S- белка (40/50 (80%) доноров), N- белка (40/50 (80%) доноров) и М-белка (45/50 (90%) доноров) (**Рис.1**). При этом Т-клеточный ответ хотя бы на 1 белок имели 47/50 (94%) доноров. Медиана количества секретирующих IFN клеток на  $1 \times 10^6$  клеток составила 27 для S-белка, 58.5 для М белка и 54.5 для N-белка.



**Рис. 1. Гуморальный и клеточный иммунный ответ у доноров, переболевших SARS-CoV-2 (N = 50).**

Индекс позитивности анти-RBD IgG антител и Т-клеточный ответ на пулы пептидов из Шиповидного (S, зеленый), Мембранного (M, красный) и Нуклеокапсидного (N, синий) белков в двух временных точках (BT1, BT2). Пунктирная линия отмечает пороговое значение позитивности. График показывает образцы от одного и того же донора, линией соединены парные точки; доля и количество доноров, имеющих ответ ниже порогового, указаны над пунктирной линией.

Через восемь месяцев после заболевания (BT2) иммунный ответ на SARS-CoV-2 значительно снизился. Только 29/50 (58%) переболевших доноров сохранили детектируемый уровень антител, при этом медиана индекса позитивности снизилась в 2 раза и составила 1.24. Т-клеточный ответ также значительно ослабел за это время: специфичные к антигенам вируса Т-клетки обнаруживались у 32/50 (64%) доноров на S-белок, у 31/50 (62%) донора на М – белок и у 26/50 (52%) доноров на N-белок. Медиана количества секретирующих IFN клеток снизилось в 2.6, 3.3 и 2.9 раз для S, M и N белков, соответственно. Таким образом в BT2 медиана количества секретирующих IFN клеток на  $1 \times 10^6$  клеток составила 10.5 для S-белка, 17.5 для M белка и 18.5 для N-белка. Тем не менее, общий Т-клеточный ответ был более стойким по сравнению с гуморальным ответом: в BT2 специфичные хотя бы к одному белку Т-клетки имели 40/50 (80%) доноров, а антитела в 1.4 раза меньшее число доноров: 29/50 (58%). Стоит отметить, что из 21 серонегативного донора 9 (42,9%) сохранили

T-клеточный иммунный ответ. Таким образом, можно сделать вывод, что T-клетки служат более надежным маркером перенесенной инфекции COVID-19, нежели антитела.

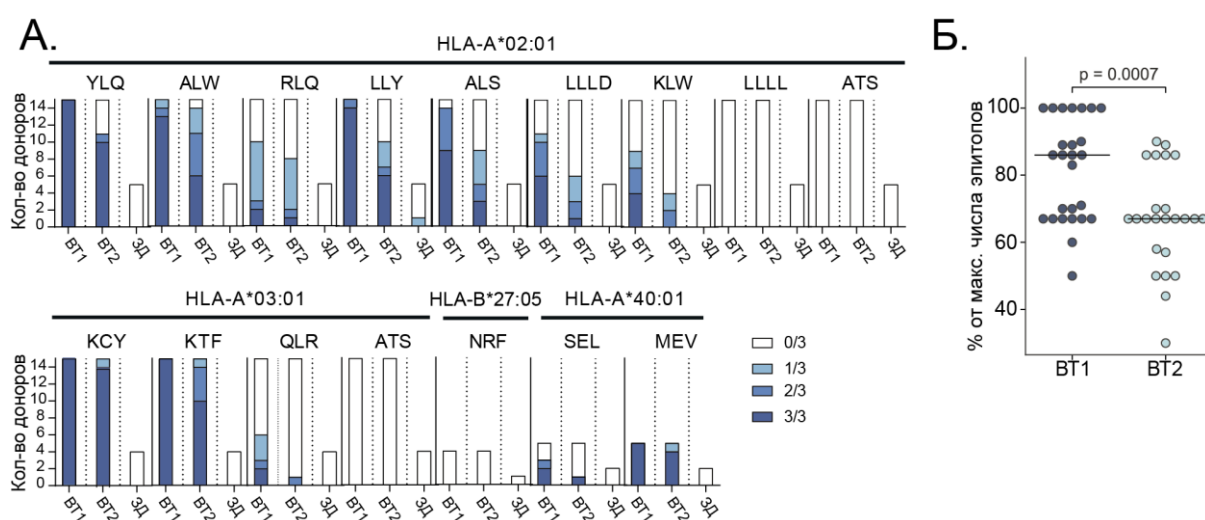
При этом у некоторых доноров в ВТ2 наблюдалось повышение уровня антител и/или количества IFN-продуцирующих T-клеток. Так, у 5/50 (10%) доноров вырос индекс позитивности антител, а у 19/50 (38%) выросла сила T-клеточного ответа. Можно предположить, что это произошло из-за того, что доноры могли контактировать с вирусом между взятием образцов крови, и, соответственно, дополнительно стимулировали T-клеточный иммунный ответ.

В пользу этого предположения также говорит тот факт, что сила T-клеточного ответа на M, N и S белки SARS-CoV-2 коррелировал между собой как в каждой из временных точек, так и между двумя временными точками, в то время как уровень антител коррелировал между ВТ1 и ВТ2, но не с силой T-клеточного ответа. Некоторые исследователи указывают на то, что возраст и пол могут коррелировать с эффективностью клеточного ответа и уровнем антител и, соответственно, могут влиять на течение болезни (O'Driscoll et al., 2021). Несмотря на широкий возрастной диапазон (от 17 до 64 лет) и сбалансированный гендерный состав выборки (54% женщин и 56% мужчин) мы не обнаружили корреляции между уровнем как клеточного, так и гуморального ответа и возрастом или полом доноров. Также сила ответа не коррелировала с тем, в какой момент после начала заболевания были взяты образцы крови внутри каждой временной точки (между 17 и 72 днем для ВТ1 или между 180 и 292 днем для ВТ2). Возможно, это могло быть связано с тем, что в выборке не было людей, перенесших заболевание в тяжелой форме.

## **2. Эпитоп-специфичный ответ CD8+ T-клеток снижается, но остается детектируемым в течение 8 месяцев после инфекции**

Центральным аспектом нашей работы был анализ ответа CD8+ T-клеток на отдельные эпитопы SARS-CoV-2 на уровне репертуара T-клеточных рецепторов.

Мы исследовали Т-клетки, специфичные к 15 эпитомам, иммуногенность которых была показана ранее в литературе, на образцах 26 доноров. Поскольку иммуногенность этих эпитопов в статьях определялась различными методами, в том числе и недостаточно специфичными, как, например, *in silico* предсказание или использование больших пулов пептидов, результаты окраски *ex vivo* Т-клеточных экспансий на эти пептиды при помощи МНС-тетрамеров показал, что в ВТ1 только 12/15 (80%) протестированных эпитопов были иммуногенными (Рис.2А).



**Рис. 2. Частота эпитоп-специфичных Т-клеток у здоровых (ЗД) и переболевших SARS-CoV-2 донорах.**

**А.** Количество лунок, содержащих эпитоп-специфичные CD8<sup>+</sup> Т-клетки после *in vitro* экспансий из лимфоцитов ПД (N = 26) и ЗД (N = 7). Высота столбика отражает количество протестированных доноров. Интенсивность цвета указывает на количество лунок, содержащих МНС-тетрамер<sup>+</sup> клетки. **Б.** Доля распознанных эпитопов от общего числа эпитопов, представляющихся в аллелях ПД. Каждая точка отражает одного донора; наличие МНС-тетрамер<sup>+</sup> клеток хотя бы в одной лунке считается положительным ответом. Парный тест Манна-Уитни, значение p указано сверху.

При этом на 11/15 (73,3%) из них эпитоп-специфичный ответ был обнаружен у более, чем 50% доноров. Шесть эпитопов (Y L Q, A L W, L L Y, K C Y, K T F, и M E V) вызывали иммунный ответ у всех доноров с релевантной аллелью,

при этом ответ на YLQ, KCY, KTF, и MEV обнаруживался в трех лунках из трех, что может говорить о высокой частоте специфичных к этим эпитопам Т-клеток. У здоровых доноров с релевантной аллелью слабый ответ был обнаружен только на один эпитоп - LLY.

Через восемь месяцев (BT2) Т-клетки, специфичные ко всем 12 иммуногенным эпитопам, все еще обнаруживались по крайней мере у части пациентов, но количество распознанных эпитопов на одного пациента значительно уменьшилось (в среднем с 81,5% до 62,7%) (Рис.2Б).

Для оценки частоты ответа для каждого эпитопа был просуммировано количество лунок, в которых были обнаружены тетрамер-положительные клетки. За 8 месяцев частота распознавания эпитопов снизилась в 1.5-5.8 раз (в среднем 2.2 раза).

У 20/26 (76.9%) доноров частота Т-клеток памяти снижалась для части эпитопов, включая двух доноров (p1495 и p1426), для которых было отмечено практически полное исчезновение антиген-специфичных клеток. В то же время у 5/26 (19.2%) доноров количество антиген-специфичных клеток не изменилось, а у 1 донора (p1445) частота антиген-специфичных клеток увеличилась к BT2. Важно отметить, что изменение силы ответа не было одинаковым для всех эпитопов: некоторые из них (например, KCY и KTF) сохраняли высокую иммуногенность в течение 8 месяцев, в то время как частота специфичных Т-клеток к другим (LLLD и KLV) значительно падала. Таким образом, можно сделать вывод о том, что антиген-специфичные Т-клетки не только формируют популяции долгоживущих Т-клеток памяти в крови, но и способны к пролиферации после стимуляции их антигеном.

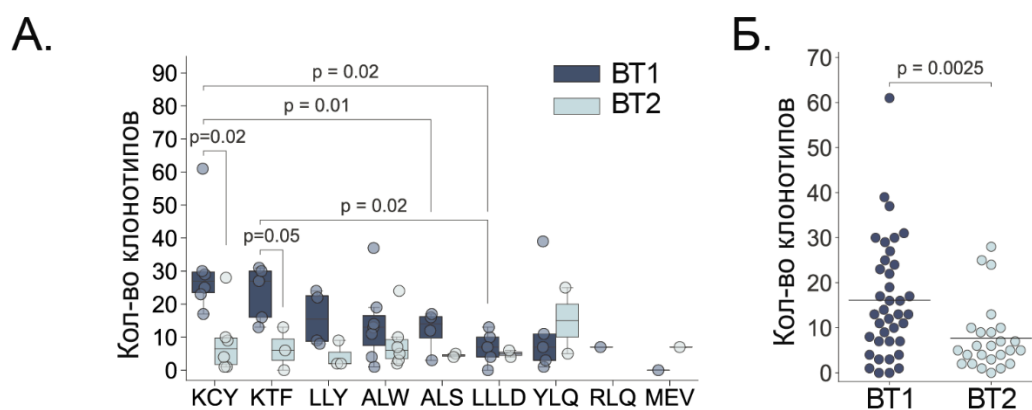
### **3. Высокое клональное разнообразие обеспечивает превалирующий эпитоп-специфичный ответ CD8+ Т-клеток**

В рамках исследования клонального разнообразия SARS-CoV-2 специфичных Т-клеточных рецепторов мы проанализировали репертуар  $\beta$  цепей

T-клеточных рецепторов (ТКРβ) МНС-тетрамер-положительных клеток и тотальных фракций периферических мононуклеаров крови. Эпитоп-специфичными клонотипами считались последовательности, которые значимо ( $p < 10^{-12}$ , точный тест Фишера) обогащались в 10 и более раз в МНС-тетрамер+ популяции по сравнению с МНС-тетрамер- фракцией того же образца.

Было определено 756 клонотипов, специфичных к 9 эпитопам. Среди всех эпитоп-специфичных клонотипов в ВТ1, клонотипы, специфичные к эпитопам КСУ и КТФ, отличались наибольшим разнообразием: для обоих эпитопов медиана количества клонов у доноров равнялась 27 (Рис.3А). Для этих же эпитопов была характерна наибольшая частота CD8 Т-клеток (Рис.2А).

В точке ВТ2 мы наблюдали тенденцию к уменьшению числа эпитоп-специфичных клонов в том числе и для эпитопов с изначально высоким числом клонотипов, таких как КСУ и КТФ (Рис.3А). Общая медиана количества клонотипов для всех эпитопов снизилась с 13 в ВТ1 до 5 в ВТ2 (Рис.3Б).

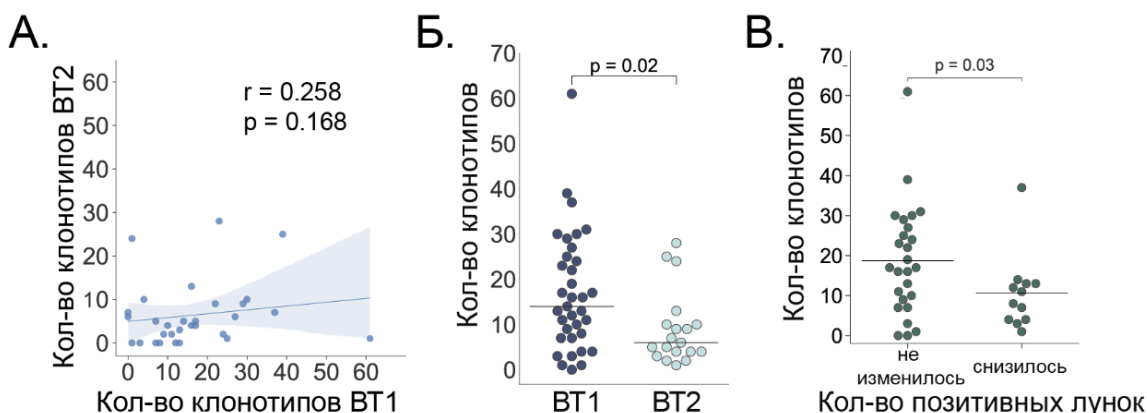


**Рис. 3. Количество SARS-CoV-2 -специфичных клонотипов снижается со временем.**

**А.** Количество клонотипов для каждого эпитопа в ВТ1 (синий) и ВТ2 (голубой).  
**Б.** Количество эпитоп-специфичных клонотипов у ПД (N = 14), где каждая точка представляет уникальную комбинацию пациент-эпитоп (медианы показаны горизонтальной линией).

Мы не нашли корреляции между клональным разнообразием Т-клеток в ВТ1 и ВТ2 (Рис.4А). Однако несмотря на то, что число клонотипов сокращалось даже у эпитопов, имеющих высокую частоту специфичных CD8 Т-клеток,

разнообразии клонального ответа было связано с лучшим сохранением эпитоп-специфичного ответа (**Рис.4Б**). Эпитопы с более стойким ответом (то есть те, частота ответа на которые была одинаковой в ВТ1 и ВТ2) характеризовались более высоким числом эпитоп-специфичных клонов в ВТ1 (**Рис.4В**).

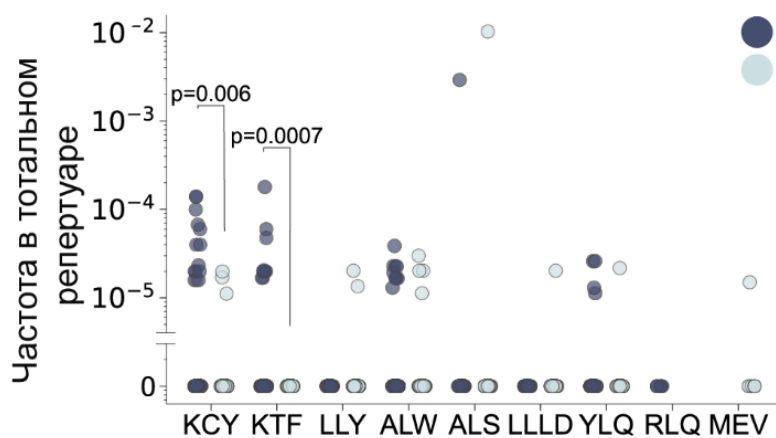


**Рис. 4. Изначальное клональное разнообразие влияет на сохранение эпитоп-специфичного ответа, но не на количество персистирующих клонов.**

**А.** Корреляция Спирмена между количеством клонотипов в ВТ1 и ВТ2.  $r$  - коэффициент корреляции. **Б.** Количество эпитоп-специфичных клонотипов, обеспечивающих ответ в трех лунках в ВТ1 и ВТ2. **В.** Количество эпитоп-специфичных клонотипов в ВТ1, которые обеспечивали не изменившийся или сниженный ответ в ВТ2.

Однако стоит отметить, что в тотальных репертуарах (т.е. полученных из периферических мононуклеаров крови доноров) обеих временных точек эпитоп-специфичные клоны занимали очень маленькую долю или вообще не обнаруживались: только 5,9% и 7,9% эпитоп-специфичных клонов из ВТ1 и ВТ2, соответственно, были обнаружены в тотальном репертуаре, при этом сами тотальные репертуары пересекались только на 3%. Что может быть связано с тем, что репертуар Т-клеток очень динамичен и претерпевает серьезные изменения в течение 6-9 месяцев.

Тем не менее, эпитопы, для которых доминантный ответ сохранялся в ВТ2 (КСУ, КТФ, YLQ и ALW), имели большее число клонотипов в ВТ1 (**Рис.5**). Однако исходный размер клонотипа не влиял на его размер в ВТ2.



**Рис.5. Эпитоп-специфичные клоны характеризуются низкой частотой в тотальном репертуаре.** Частота эпитоп-специфичных клонотипов в крови в BT1 (темно-синий) и BT2 (светло-синий).

Низкая частота эпитоп-специфичных клеток в тотальных репертуарах также стала объяснением того, почему клональный репертуар эпитоп-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток значительно различался между двумя временными точками. Из 756 описанных клонотипов (включая одинаковые, встречающиеся у нескольких доноров) только 40 (5,3%) были обнаружены в обеих временных точках. Мы не обнаружили зависимости между стойкостью эпитоп-специфичного ответа и частотой клонотипов в тотальном репертуаре в BT1: только 8 клонотипов, обнаруженных в обеих временных точках, были также найдены в тотальных репертуарах.

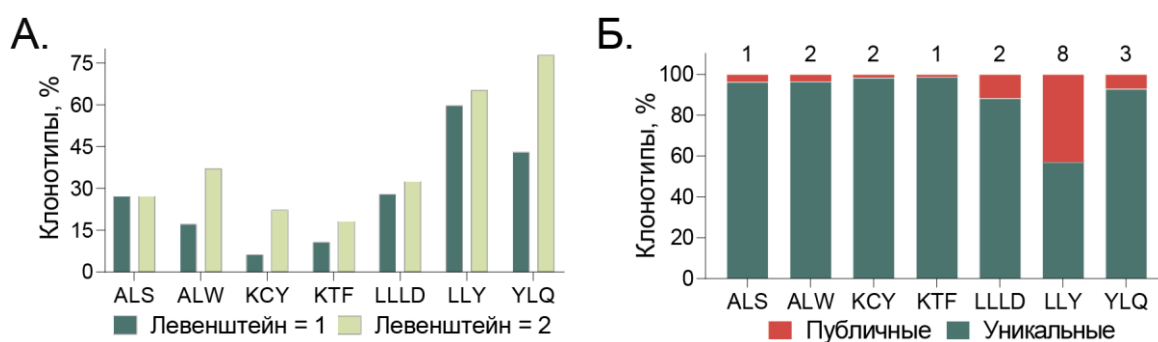
#### **4. Разнообразие эпитоп-специфичных клеток обеспечивает их длительное персистирование в крови**

Для определения ключевых характеристик, обеспечивающих длительное сохранение эпитоп-специфичных клеток, была изучена структура репертуара Т-клеточных рецепторов семи из девяти эпитопов, для которых репертуары ТКР были получены для больше, чем одного донора. Для каждого эпитопа были построены графы, отражающие уровень схожести их CDR3 $\beta$ . Наиболее схожие между собой последовательности формировали кластеры. В качестве критерия схожести было взято расстояние Левенштейна. В случае, когда была разрешена только одна аминокислотная замена, вставка или удаление (максимальное расстояние Левенштейна = 1), наибольший уровень кластеризации (т.е.



наибольшее количество последовательностей, входящих в кластер) продемонстрировали Т-клетки, специфичные к LLY и YLQ: в кластеры вошло 59,7% и 43% клонотипов соответственно. Наименее схожими оказались клонотипы, специфичные для KTF и KCY: в состав кластеров вошло всего 10,7% и 6,2% клонотипов, соответственно (Рис.6А).

Другой характеристикой ТКР является уровень публичности клонов - количество одинаковых аминокислотных последовательностей CDR3 $\beta$ , обнаруженных у разных людей. Из 715 уникальных специфичных к эпитомам ALS, ALW, KCY, KTF, LLLD, LLY и YLQ клонотипов 19 были публичными, т.е. одна и та же аминокислотная последовательность CDR3 $\beta$  была общей для 2-4 человек в когорте. Эпитоп LLY характеризовался наибольшим уровнем публичности: восемь клонотипов были обнаружены более чем у одного донора в нашей выборке. При этом эти клонотипы занимали 43,1% всего LLY-специфичного репертуара. Наименее публичными были KTF- и KCY-специфичные клонотипы: всего один и два из них, соответственно, были обнаружены у нескольких доноров (Рис.6Б).

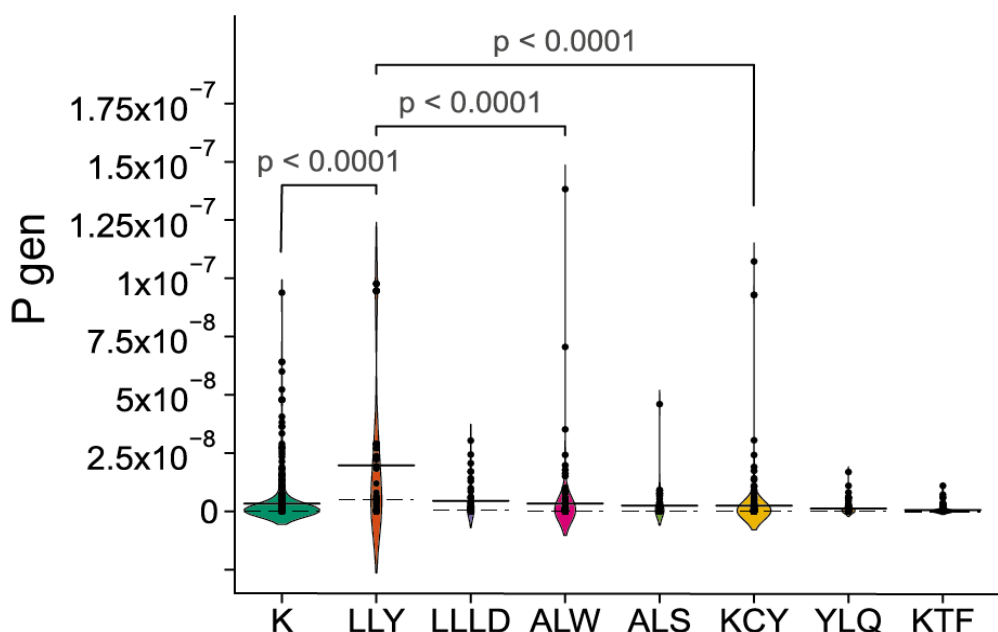


**Рисунок 6. Клональная структура эпитоп-специфичного ответа на SARS-CoV-2.**

**А.** Доля кластеризованных эпитоп-специфичных клонотипов Т-клеток. **Б.** Доля, занимаемая публичными (темно-красные) и уникальными (темно-зеленые) эпитоп-специфичными клонотипами. Количество публичных клонов указано вверху.

Высокая публичность LLY-специфичных эпитопов может объясняться высокой вероятностью сборки этих рецепторов в процессе V(D)J-рекомбинации,

которая описывается параметром  $P_{gen}$ . Для каждого эпитоп-специфичного репертуара с помощью алгоритма OLGA (Sethna et al., 2019) была рассчитана величина  $P_{gen}$ . В качестве контроля были использованы 31874 аннотированных в базе VDJdb последовательности CDR3 $\beta$ , специфичные к различным эпитопам МНСI из белков цитомегаловируса (ЦМВ), вируса Эпштейна-Барр (ВЭБ) и вируса гриппа А. Было показано, что LLY-специфичные клонотипы обладают значительно более высокой вероятностью V(D)J-рекомбинации по сравнению с клонотипами другой специфичности. Медианное значение  $P_{gen}$  для этого эпитопа было  $5,16 \times 10^{-9}$ , в то время как для контрольного набора это значение составило  $1,39 \times 10^{-10}$  (Рис.7).

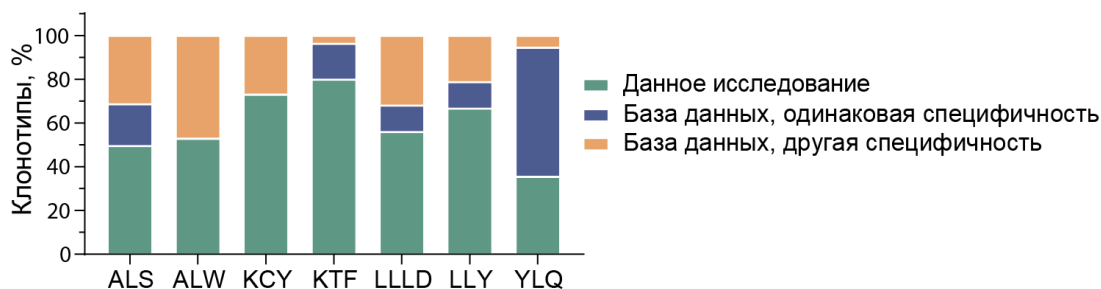


**Рис.7. Вероятность V(D)J-рекомбинации эпитоп-специфичных CDR3 $\beta$ .**

Вероятность V(D)J-рекомбинации с учетом использования конкретных V- и/или J-генов рассчитана с помощью алгоритма OLGA (Sethna et al., 2019). Сплошная линия показывает среднее значение, а пунктирная линия - медиану  $P_{gen}$ . К - контрольная выборка из 31874 ЦМВ-, ВЭБ- и грипп А-специфичных CDR3 $\beta$  (на рисунке отображены только значения  $P_{gen}$  для 500 случайных CDR3 $\beta$ ).

Для того, чтобы проверить специфичность CDR3 $\beta$ , полученных в данной работе, мы сравнили их последовательности с последовательностями CDR3 $\beta$ , аннотированными как распознающие те же эпитопы в наборе данных Multiplex Identification of T cell Receptor Antigen Specificity (MIRA)(Snyder et al., 2020) и

базе данных VDJdb (<http://vdjdb.cdr3.net>) (Shugay et al., 2018; Bagaev et al., 2020). Обе базы данных содержали ТКР, специфичные для эпитопов LLY, YLQ, KTF и ALS, которые были очень похожи на последовательности, полученные в этом исследовании (Рис. 8).



**Рис. 8. Кластеризация эпитоп-специфичных CDR3 $\beta$  последовательностями из баз данных.**

Доля похожих последовательностей CDR3 (расстояние Левенштейна  $\leq 1$ ) из текущего исследования (зеленый), аннотированных в базах данных MIRA или VDJdb с такой же (синий) или другой специфичностью (желтый).

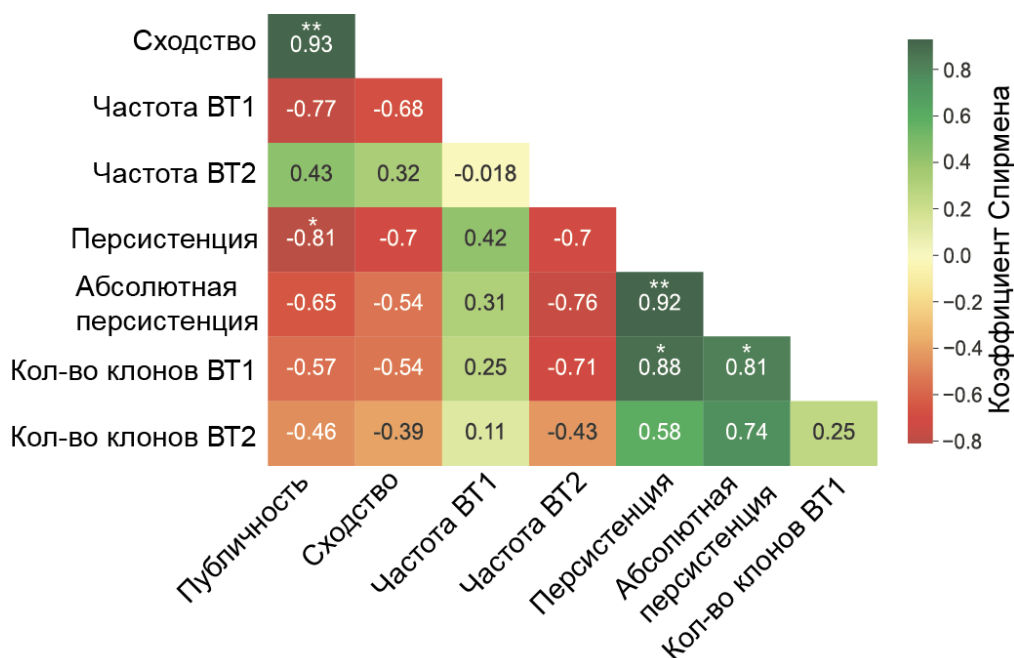
Ни MIRA, ни VDJdb не содержали рецепторов, аннотированных как специфичные для эпитопов ALW и KCY. Тем не менее, мы обнаружили некоторые сходные (максимальное расстояние Левенштейна = 1) последовательности CDR3 $\beta$ , которые были помечены как специфичные для других эпитопов SARS-CoV-2. Мы обнаружили, что 32% специфичных для ALW клонотипов, описанных в этом исследовании, были сходны с YLQ-специфичными последовательностями CDR3 $\beta$  из базы данных MIRA. Высокая кросс-реактивность наблюдалась для KCY, для которого 83 (26,9%) клонотипа, входящих в кластеры, имели последовательности CDR3 $\beta$  с другой специфичностью. Такое высокое сходство между областями CDR3 $\beta$ , распознающими различные эпитопы, может быть объяснено высоким вкладом цепи Т-клеточного рецептора или распознаванием на основе зародышевой линии, опосредованным CDR1 и CDR2.

Чтобы определить факторы, вносящие наибольший вклад в стойкость иммунного ответа на конкретный эпитоп, мы оценили корреляцию между:

- публичностью (долей клонов, обнаруженных более, чем в одном доноре);

- сходством (долей клонов, входящих в кластер);
- средней частотой специфичных для эпитопа клонотипов в общем репертуаре в ВТ1 или в ВТ2;
- средним количеством клонов в ВТ1 или ВТ2;
- персистенция (долей эпитоп-специфичных ответов в ВТ1, сохранившихся в ВТ2);
- абсолютная персистенция (долей эпитоп-специфичных ответов в ВТ1, сохранившихся в ВТ2 и детектированных в 3/3 лунках экспансии).

В результате было показано, что изначальное количество специфичных к эпитопу клонов в наибольшей мере влияло как на стабильность, так и на повышенную стабильность эпитоп-специфичного ответа (Рис.9). Это подчеркивает важность индукции поликлонального ответа для формирования долговременной Т-клеточной памяти.



**Рис.9. Влияние различных характеристик Т-клеточного репертуара на сохранность ответа во времени.**

Корреляция Спирмена между различными параметрами эпитоп-специфичного ответа Т-клеток на SARS-CoV-2.

Тест Манна-Уитни, значения р указаны только там, где была достигнута значимость. \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$

## ВЫВОДЫ

1. Медиана уровня IgG антител к RBD белку снижаются со временем в 2 раза, а медиана количества Т-клеток, продуцирующих интерферон в ответ на стимуляцию S-, M- и N- белками вируса SARS-CoV-2, снижается со временем в 2.6, 3.3 и 2.9 раз соответственно. Через 8 месяцев после инфекции Т-клеточный ответ детектируется в 1.4 раза чаще, чем гуморальный.

2. Доля эпитопов, распознаваемых специфичными CD8<sup>+</sup> Т-клетками памяти, снижается с 81,5% до 62,7% в течение 8 месяцев после инфекции.

3. Высокочастотный Т-клеточный иммунный ответ на эпитопы вируса SARS-CoV-2 обеспечивается разнообразными уникальными клонами CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

4. Разнообразие эпитоп-специфичных CD8<sup>+</sup> Т-клеток способствует длительному персистированию Т-клеток памяти в крови. Размер, занимаемый клоном, не оказывает существенного влияния на длительность его персистирования в крови.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science:

1. **Zornikova K.V.**, Sheetikov S.A., Rusinov A.Yu., Iskhakov R.N., Bogolyubova A.V. Architecture of the SARS-CoV-2-specific T cell repertoire // *Frontiers in Immunology*. 2023. V.14. Импакт-фактор (WoS) – 8.786 (1,04/0,83)\*

2. **Zornikova K.V.**, Khmelevskaya A., Sheetikov S.A., Kiryukhin D.O., Shcherbakova O.V., Titov A., Zvyagin I.V., Efimov G.A. Clonal diversity predicts persistence of SARS-CoV-2 epitope-specific T-cell response // *Communications Biology*. 2022. V.9. №. 5(1). P.1351. Импакт-фактор (WoS) – 6.548 (1,27/0,8)

---

\* В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.

3. Goncharov M., Bagaev D., Shcherbinin D., Zvyagin I., Bolotin D., Thomas PG., Minervina A.A., Pogorelyy M.V., Ladell K., McLaren J.E., Price D.A., Nguyen T.H.O., Rowntree L.C., Clemens E.B., Kedzierska K., Dolton G., Rius C.R., Sewell A., Samir J., Luciani F., **Zornikova K.V.**, Khmelevskaya A.A., Sheetikov S.A., Efimov G.A., Chudakov D., Shugay M. VDJdb in the pandemic era: a compendium of T cell receptors specific for SARS-CoV-2 // Nature Methods. 2022. V. 19. № 9. P. 1017-1019. Импакт-фактор (WoS) -28.547 (0,35/0,07)
4. Titov A., Shaykhutdinova R., Shcherbakova O. V., Serdyuk Y. V., Sheetikov S.A., **Zornikova K. V.**, Maleeva A. V., Khmelevskaya A., Dianov D. V., Shakirova N.T., Malko D.B., Shkurnikov M., Nersisyan S., Tonevitsky A., Khamaganova E., Ershov A. V., Osipova E.Y., Nikolaev R. V., Pershin D.E., et al. Immunogenic epitope panel for accurate detection of non-cross-reactive T cell response to SARS-CoV-2 // JCI Insight. 2022. V. 7. № 9. Импакт-фактор (WoS) - 9.484 (2,19/0,44)
5. Shomuradova A.S., Vagida M.S., Sheetikov S.A., **Zornikova K. V.**, Kiryukhin D., Titov A., Peshkova I.O., Khmelevskaya A., Dianov D. V., Malasheva M., Shmelev A., Serdyuk Y., Bagaev D. V., Pivnyuk A., Shcherbinin D.S., Maleeva A. V., Shakirova N.T., Pilunov A., Malko D.B., et al. SARS-CoV-2 Epitopes Are Recognized by a Public and Diverse Repertoire of Human T Cell Receptors // Immunity. 2020. V. 53. № 6. P. 1245- 1257.e5. Импакт-фактор (WoS) – 22.553 (2,19/0,55)
6. Molodtsov I.A., Kegeles E., Mitin A.N., Mityaeva O., Musatova O.E., Panova A.E., Pashenkov M.V., Peshkova I.O., Alsalloum A., Asaad W., Budikhina A.S., Deryabin A.S., et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2)-Specific T Cells and Antibodies in Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Protection: A Prospective Study // Clinical Infection Diseases. 2022. V. 75. № 1. P. e1-e9. Импакт-фактор (WoS) – 20.999 (1,04/0,16)

