

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр
гематологии» Министерства здравоохранения Российской
Федерации**

На правах рукописи

Зорникова Ксения Викторовна

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

3.2.7 – Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Ефимов Григорий Александрович

Москва

2023

Оглавление

Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1. Вирус SARS-CoV-2.....	11
1.2. Иммунный ответ на SARS-CoV-2.....	14
1.2.1. Патологическое состояние при иммунном ответе.....	14
1.2.2. Гуморальный иммунный ответ.....	15
1.2.3. Т-клеточный иммунный ответ.....	17
1.2.4. Иммунный ответ CD8 ⁺ Т-клеток при COVID-19.....	20
1.2.5. Иммунный ответ CD4 ⁺ Т-клеток при COVID-19.....	22
1.2.6. Т-клеточная память при COVID-19.....	23
1.2.7. Антигенная специфичность иммунного ответа.....	24
1.2.8. Кросс-реактивный иммунный ответ.....	28
1.3. Репертуар Т-клеточных рецепторов.....	32
1.3.1. Структурное разнообразие ТКР, определяющее специфичность к антигену.....	32
1.3.2. Специфичность кластеризации ТКР, основанной на сходстве последовательностей.....	33
1.3.3. Количественная оценка клональности, разнообразия и сходимости репертуаров ТКР.....	34
1.3.4. Т-клеточный репертуар при SARS-CoV-2.....	35
Глава 2. Материалы и методы.....	37
2.1. Методы работы с эукариотическими клетками.....	37
2.1.1. Доноры.....	37
2.1.2. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC).....	40
2.1.3. In vitro антиген-специфичные экспансии из Т-клеток.....	40
2.1.4. Окрашивание клеток при помощи МНС-тетрамеров.....	41
2.2. Молекулярно-биохимические методы.....	41
2.2.1. Генотипирование HLA.....	41
2.2.2. Пептиды SARS-CoV-2.....	45
2.2.3. Производство биотинилированных МНС I-пептидных комплексов.....	48

2.2.4. Иммуноферментный анализ (ИФА)	49
2.2.5. ELISpot на интерферон- γ (IFN γ)	50
2.2.6. Выделение тотальной РНК	50
2.2.7. Синтез комплементарной ДНК (кДНК)	52
2.2.8. Секвенирование	52
2.3. Обработка данных	53
2.3.1. Анализ репертуаров Т-клеточных рецепторов	53
2.3.2. Количественная оценка и статистический анализ	53
Глава 3. Результаты	55
3.1. Клеточный иммунный ответ при COVID-19 развивается чаще и сохраняется дольше, чем гуморальный	55
3.2. Эпитоп-специфичный ответ CD8 ⁺ Т-клеток снижается, но остается детектируемым в течение 8 месяцев после инфекции	62
3.3. Высокое клональное разнообразие обеспечивает превалирующий эпитоп-специфичный ответ CD8 ⁺ Т-клеток	67
3.4. Разнообразие эпитоп-специфичных клеток обеспечивает их длительное персистирование в крови	72
Глава 4. Обсуждение результатов	81
Выводы	85
Список литературы	86

Список сокращений

АК – аминокислота

ВТ1 – временная точка 1

ВТ2 – временная точка 2

ЗД – здоровый донор

ИФА - иммуноферментный анализ

ПД – переболевший донор

ТКР – Т-клеточный рецептор

ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2

CDR – гипервариабельный участок

E – Envelope, белок оболочки SARS-CoV-2

HCoV – коронавирусы, способные заражать человека

IFN γ – интерферон-гамма

IL – интерлейкин

M (от Membrane) – мембранный белок SARS-CoV-2

MHC – главный комплекс гистосовместимости

MIRA – Multiplex Identification of T cell Receptor Antigen Specificity

N (от Nucleocapsid) - нуклеокапсидный белок SARS-CoV-2

ORF – открытая рамка считывания

PBMC – периферические мононуклеары крови

RBD (от Receptor-binding domain) – рецептор-связывающий домен S- белка SARS-CoV-2

S (от Spike) – шиповидный белок SARS-CoV-2

T_{cm} – Т-клетки центральной памяти

T_{em} – эффекторные Т-клетки памяти

T_h – Т-хелперы

T_{fh} – фолликулярные Т-хелперы

TLR – Toll-подобные рецепторы

TNF - фактора некроза опухоли

Введение

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⁺ и CD8⁺ 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 мы поставили перед собой следующие **задачи**:

1. Оценка изменения уровня анти-RBD IgG антител и силы Т-клеточного ответа у людей спустя 8 месяцев после перенесения инфекции COVID-19;
2. Оценка изменения частоты CD8⁺ Т-клеток памяти, специфичных к иммуногенным эпитопам вируса SARS-CoV-2;
3. Анализ клонального состава эпитоп-специфичных CD8⁺ 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 β 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 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 выявления 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 инфекционное заболевание, 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). Подробная информация о донорах представлена в разделе “Доноры” и **Таблице 1** в Материалах и методах.

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 смесь пептидов из М, N и S белков SARS-CoV-2, который оценивался по продукции IFN γ методом ELISPOT.

Для изучения Т-клеточного ответа на уровне индивидуальных эпитопов, были использованы 15 эпитопов из различных белков SARS-CoV-2, презентруемых в 4 распространенных аллелях HLA I. На основе HLA-типирования были отобраны 26 доноров, имеющих хотябы одну из выбранных аллелей (от 5 до 15 доноров на каждую аллель). 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.

Для определения последовательностей β -цепей ТКР, МНС-тетрамер-положительные и МНС-тетрамер-отрицательны фракции клеток сортировались при помощи клеточного сортера. 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 γ 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: 6 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 –Иммунология.

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

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

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

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

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

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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Вирус SARS-CoV-2

Вирус SARS-CoV-2 относится к семейству коронавирусов. Это покрытые оболочкой вирусы диаметром 80-220 нм, содержащие одноцепочечный (+) РНК геном. Семейство коронавирусов *Coronaviridae* подразделяется на два подсемейства: *Letovirinae* и *Orthocoronavirinae*. *Letovirinae* включает единственный род *Alphaletovirus*, в то время как *Orthocoronaviridae* включает четыре рода, различающихся по структуре генома: *Alphacoronavirus* (α -CoV), *Betacoronavirus* (β -CoV), *Gammacoronavirus* (γ -CoV) и *Deltacoronavirus* (δ -CoV), которые содержат 17, 12, 2 и 7 уникальных видов соответственно (ICTV 2018). Коронавирусы способны заражать широкий спектр домашних животных: α - и β -CoV являются вирусами млекопитающих, а γ - и δ -CoV в основном заражают птиц. Коронавирус, способный заражать человека (HCoV), был впервые выделен в 1960 году из пациентов, госпитализированных с симптомами простуды, и получил название B814 (Tyrrrell & Bynoe, 1965). На данный момент существует семь различных HCoV — это 229E, NL63, которые принадлежат к роду α -CoV, и HKU1, OC43, SARS, MERS, которые принадлежат к роду β -CoV. В декабре 2019 года впервые был обнаружен новый представитель этого семейства, относящийся к β -CoV: SARS-CoV-2 (Zhu et al., 2020; Kobayashi et al., 2022; Wu et al., 2022).

Существует две основные теории возникновения вируса SARS-CoV-2. Первая заключается в том, что он эволюционировал в патогенное состояние у животных (предположительно у летучих мышей или панголин *Manis javanica*), а затем перешел к людям, а вторая - в том, что животные распространяли не вызывающий заболевание у людей вирус, который, попав в человека, затем эволюционировал в патогенный вирус (Andersen et al., 2020).

Вирион SARS-CoV-2 имеет сферическую форму диаметром 108 ± 8 нм. Наружная поверхность вириона покрыта шиповидным (Spike или S) белком,

тримеры которого сильно гликозилированы, что в сочетании с гликановой оболочкой позволяет вирусу связываться с клеточным рецептором - ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2), защищаясь при этом от нейтрализующих антител (Turoňová et al., 2020; Yao et al., 2020). Помимо рецептора ACE2, вирус также может использовать для попадания в клетки рецепторы CD147 и CD209L (Wang et al., 2020b; Amraei et al., 2021). Наружная мембрана вируса содержит мембранный белок (Membrane или M) и белок оболочки (Envelope или E). Вирус содержит рибонуклеопротеиновые комплексы (Ribonucleoprotein или RNP) состоящие из белка нуклеокапсида (Nucleocapsid или N) и вирусного генома (Yao et al., 2020). В геноме вируса SARS-CoV-2 присутствуют неструктурная РНК, включающая открытые рамки считывания (Open Reading Frames или ORF): ORF1ab, ORF3, ORF6, 7a, 8, и ORF10, среди которых наиболее консервативная ORF1ab содержит информацию, необходимую для синтеза и репликации (Tsai et al., 2020).

Жизненный цикл вируса SARS-CoV-2 представлен на **Рис.1**. При попадании вируса в организм один из участков S белка - рецептор-связывающий домен (Receptor-binding domain или RBD) взаимодействует с рецептором ACE2. В результате этого взаимодействия происходит интернализация вируса клеткой. Внутри эндосомы катепсин В или L опосредует расщепление субъединиц S1 и S2 шиповидного белка. Расщепление может также происходить и на поверхности клетки за счет взаимодействия субъединиц S1/S2 с мембрано-связанной сериновой протеазой 2 (TMPRSS2). В результате этого происходит слияние клеточной и вирусной мембран и высвобождение вирусной РНК в цитоплазму клетки-хозяина (Jackson et al., 2022). В цитоплазме начинается трансляция ORF-1a и ORF-1b, что приводит к образованию двух больших полипротеинов. Эти полипротеины расщепляются протеазами, кодируемыми вирусом, на 16 отдельных неструктурных белков, которые в конечном итоге формируют вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу и другие вспомогательные белки для сборки вируса. Репликация начинается в индуцированных вирусом

двумембранных везикулах, полученных из эндоплазматического ретикулума, которые в конечном итоге сливаются, образуя сложные сети извитых мембран. Непрерывная репликация и транскрипция приводят к образованию субгеномной РНК, которая в конечном итоге преобразуется в многочисленные структурные и вспомогательные белки. Гликопротеины Е после синтеза встраиваются в эндоплазматический ретикулум или в аппарат Гольджи. Одноцепочечная (+) РНК соединяется с белками капсида с образованием нуклеокапсида, который вставляется в промежуточное звено между эндоплазматическим ретикулумом и аппаратом Гольджи (ERGIC) для сборки вириона. Наконец, везикулы, загруженные вирусными частицами, сливаются с клеточной мембраной для выхода вируса из клетки (Harrison et al., 2020; Shah et al., 2020).

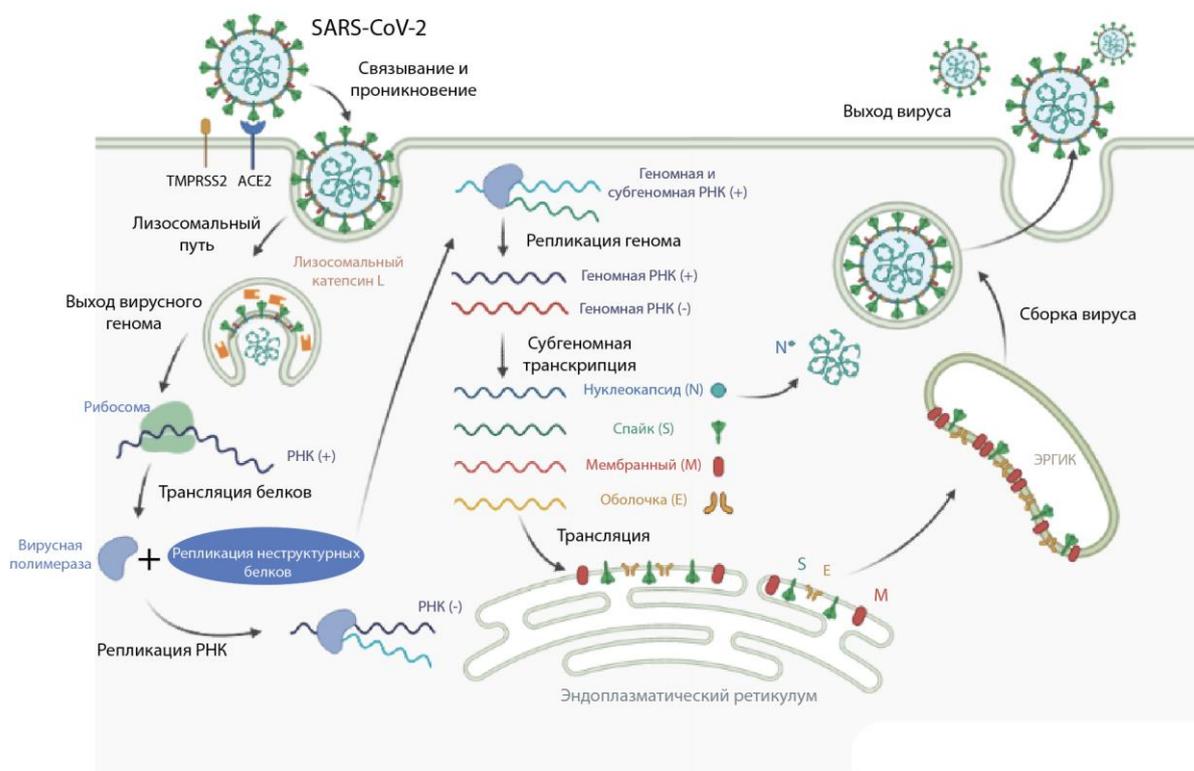


Рисунок 1. Жизненный цикл вируса SARS-CoV-2. Изображение создано при помощи ресурса biorender.com.

Рецепторы, способствующие проникновению SARS-CoV-2 в клетки, широко экспрессируются во всех типах тканей у людей. Наиболее высокий уровень экспрессии рецептора ACE2 характерен для тонкого кишечника, почек,

сердца, щитовидной железы, жировой ткани и верхних дыхательных путей, в то время как в легких и толстом кишечнике рецептор экспрессируется на среднем уровне (Li et al., 2020). Однако для попадания в клетки вирусу необходимы фурин и TMPRSS2, которые лучше экспрессированы в легких, поэтому размножение вируса в основном происходит именно в легких (Lukassen et al., 2020).

1.2. Иммунный ответ на SARS-CoV-2

1.2.1. Патологическое состояние при иммунном ответе

Как только вирус попадает внутрь организма, иммунная система хозяина распознает вирус, запуская реакции врожденного и адаптивного иммунного ответа. Распознавание в основном происходит через расположенные в эндосомах Toll-подобные рецепторы (TLR) 7 и 8, распознающие одноцепочечную РНК вируса, а также TLR3, TLR4 и др. Сигнал через эти рецепторы приводит к запуску каскада реакций IRF3 и NF-κB путей, в результате чего увеличивается выработка интерферона (IFN) I и III типов, а также других провоспалительных цитокинов, например, интерлейкинов (IL) -1, -6, -8 (Harrison et al., 2020). Однако такая высокая концентрация воспалительных цитокинов/хемокинов не только вызывает расширение сосудов, позволяющее рекрутировать иммунные клетки к очагу инфекции, но и усиливает разрушительное повреждение тканей. Расширение сосудов и нарушение барьерной функции ведет к отеку легких, ограничивает газообмен, что способствует формированию гипоксической среды и приводит к дыхательной или полиорганной недостаточности. Провоспалительная среда побуждает эндотелиальные клетки усиливать экспрессию молекул адгезии лейкоцитов, тем самым агрегируя иммунные клетки, которые также могут способствовать быстрому прогрессированию дыхательной недостаточности. Гипервоспаление в легких еще больше способствует транскрипционным изменениям в макрофагах и нейтрофилах, что усиливает повреждение тканей, и в конечном итоге может привести к

необратимому повреждению легких (Harrison et al., 2020). Однако некоторые белки SARS-CoV-2 ингибируют IFN I и IFN III опосредованный ответ (Kim et al., 2021).

1.2.2. Гуморальный иммунный ответ

Гуморальный ответ на вирус формируется в результате представления антиген-презентирующими клетками антигенов вируса Т-хелперным (Th) клеткам, в результате чего происходит секреция ими цитокинов и активация В-клеток в условиях антигенного стимула через В-клеточный рецептор. При стимуляции вирусными антигенами большинство В-клеток пролиферируют и дифференцируются в плазматические клетки для выработки специфических антител против SARS-CoV-2. Одновременно небольшая доля В-клеток развивается в В-клетки памяти, специфичные к SARS-CoV-2. Специфические антитела (в первую очередь нейтрализующие), вырабатываемые плазматическими клетками, могут нейтрализовать SARS-CoV-2 и блокировать взаимодействие между S белком и рецептором ACE2 (Zheng et al., 2020).

Большинство серологических исследований свидетельствуют о том, что связывающие антитела IgM появляются между 8 и 12 днем и исчезают к 12 неделе после заражения. Связывающие антитела IgG, напротив, появляются позже (14-й день) и сохраняются дольше. Согласно исследованиям, уровень сероконверсии составлял 91-99% (Gudbjartsson et al., 2020; Wajnberg et al., 2020). При этом у более чем 80% людей IgM и IgG сероконверсия происходила на 8-10 день после появления симптомов. Однако динамика гуморального ответа напрямую зависит не только от типа антител, но и от антигена. На начальных этапах заражения у практически 90% заболевших детектируются анти-N IgA антитела и у более, чем 50% анти-N IgM и IgG. Доля людей с антителами к S белку очень мала в первую неделю после появления симптомов и увеличивается только к 14-21 дню. Через месяц после заражения 96-98% людей, перенесших COVID-19, имеют IgG антитела как к N, так и к S белкам (Ren et al., 2020).

Сила гуморального IgG-опосредованного ответа, по-видимому, связана как с вирусной нагрузкой, так и с тяжестью заболевания (Zhao et al., 2020): при бессимптомном течении болезни уровень IgG был значительно ниже, чем при наличии симптомов. Кроме того, у 40% пациентов с бессимптомным течением болезни титр антител был ниже детектируемого порога сразу после выздоровления в то время, как только у 13% пациентов, имевших симптомы заболевания, IgG антитела не выявлялись в ранней фазе выздоровления (Long et al., 2020).

Среди IgG антител выделяют нейтрализующие антитела, которые часто рассматриваются как основной фактор защиты от повторного заражения: их титр коррелирует с сохранением иммунного ответа на различные вирусные инфекции (Zinkernagel et al., 2006). У большинства пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, нейтрализующие антитела появляются на 14-20 день после заражения (Wang et al., 2020c). Титр нейтрализующих антител имеет позитивную корреляцию с возрастом, тяжестью заболевания и, как правило, выше у мужчин. Другие исследования также показали, что у молодых людей и людей среднего возраста титр нейтрализующих антител был ниже, чем у пожилых (Klein et al., 2020). Однако достаточный титр нейтрализующих антител детектируется только у половины переболевших пациентов, в то время как связывающие антитела вырабатываются у более чем 90% людей (Nayak et al., 2021). Кроме того, у людей, перенесших заболевание бессимптомно или со средней тяжестью, уровень нейтрализующих антител снижался значительно после 10 месяца, по сравнению с людьми, перенесшими заболевание в тяжелой форме. При этом общий уровень IgG также снижался, однако доля таких пациентов была ниже: всего 10% по сравнению с 50% доноров без нейтрализующих антител (Yang et al., 2022).

Несмотря на то, что изначальный уровень циркулирующих связывающих и нейтрализующих антител сильно различаются у разных людей, у большинства пациентов гуморальный ответ ослабевает в течение первых 6-10 месяцев после заражения (Dan et al., 2021; Sherina et al., 2021; Wheatley et al., 2021), причем

наибольшая скорость убывания характерна для нейтрализующих антител (Yang et al., 2022). Однако специфичные В-клетки памяти не только не исчезают после выздоровления (Vyazrova et al., 2021; Marcotte et al., 2022; Sherina et al., 2021; Sokal et al., 2021), но даже наоборот, их число увеличивается в течение первых шести месяцев после заражения и сопровождается накоплением соматических мутаций в тяжелых и легких цепях иммуноглобулинов и выработкой антител с повышенной нейтрализующей активностью (Gaebler et al., 2021).

1.2.3. Т-клеточный иммунный ответ

При заражении SARS-CoV-2 иммунная защита обеспечивается не только антителами, но и Т-клетками. Основная защитная роль отведена цитотоксическим CD8⁺ Т-клеткам, распознающим антигены вируса, представленные в контексте главного комплекса гистосовместимости I класса (МНС I). Однако CD4⁺ Т-клетки также участвуют в иммунной защите.

Развитие Т-клеточного иммунного ответа, в частности цитотоксических лимфоцитов, начинается спустя 7 дней от начала симптомов и достигает своего пика на 14 день. Уровень Т-лимфоцитов коррелирует с уменьшением вирусной нагрузки и снижением тяжести заболевания (Bergamaschi et al., 2021; Notarbartolo et al., 2021).

Появление в крови пациентов в острой фазе заболевания фолликулярных Т-хелперов (Tfh), а также CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, экспрессирующих маркеры активации CD38⁺ HLA-DR⁺, говорит об их участии в элиминации вируса (Thevarajan et al., 2020). Tfh-клетки являются специализированной субпопуляцией CD4⁺ Т-клеток, играющей ключевую роль в выработке антител, созревании и развитии В-клеток памяти и плазматических клеток. Более того, дифференцировка Т-хелперов в Tfh-клетки при остром COVID-19 коррелирует с уровнем антител при выздоровлении. Высокий уровень ($\approx 50-90\%$ у некоторых пациентов отделения интенсивной терапии) гиперактивированных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, характеризующихся высокой и длительной экспрессией CD38/HLA-

DR, наоборот, коррелируют с тяжелым течением COVID-19 (Koutsakos et al., 2021).

Другой характерной особенностью течения заболевания является лимфопения (Diao et al., 2020; Tan et al., 2020a). Причем, как правило, это состояние ассоциируется с тяжестью заболевания, но приходит в норму после выздоровления (Tan et al., 2020a). У многих пациентов лимфопения выражается в сниженном количестве CD4⁺ Т-клеток, CD8⁺ Т-клеток, В-клеток и естественных киллеров (Giamarellos-Bourboulis et al., 2020; Kuri-Cervantes et al., 2020); другие данные свидетельствуют о том, что инфекция SARS-CoV-2 преимущественно снижает количество CD8⁺ Т-клеток (Chua et al., 2020; Mathew et al., 2020). Лимфопения является характерной чертой многих респираторных вирусных инфекций, таких как инфекции, вызванные вирусом гриппа А H3N2, риновирусом человека или респираторно-синцитиальным вирусом, но лимфопения при этих и других инфекциях обычно возникает на 2-4 день после появления симптомов и быстро проходит (McClain et al., 2013). Лимфопения же, ассоциированная с COVID-19, может быть более выраженной и длиться дольше. Возможно, что лимфопения, наблюдаемая у пациентов с COVID-19, вызвана миграцией лимфоцитов в дыхательные пути или их адгезией к воспаленному эндотелию сосудов в дыхательной системе. Тем не менее, убедительных доказательств этой теории обнаружено не было: несмотря на то, что в образцах тканей легких и бронхоальвеолярного лаважа действительно выявляют лимфоциты, их инфильтрация не является чрезмерной (Wichmann et al., 2020). Согласно другим исследованиям лимфопения при тяжелом течении заболевания может быть связана с высокими уровнями IL-6, IL-10 или фактора некроза опухоли (TNF) (Diao et al., 2020; Giamarellos-Bourboulis et al., 2020) за счет прямого воздействия этих цитокинов на популяции Т-клеток и /или косвенного воздействия через другие типы клеток, таких как дендритные клетки и нейтрофилы. Гиперактивация Т-клеток или высокие уровни экспрессии проапоптотических молекул, таких как FAS (также известный как CD95)

(Mathew et al., 2020), TRAIL или каспаза 3 (Laing et al., 2020), также могут способствовать истощению Т-клеток.

Таким образом, хотя механизмы лимфопении при COVID-19 остаются не до конца понятными, уменьшение количества Т-клеток, в частности, на периферии, является характерной чертой для многих людей с тяжелым течением заболеванием и также может служить прогностическим фактором.

Важность Т-клеток в контроле тяжести и продолжительности заболевания была продемонстрирована в исследованиях на животных и людях. Исследования на приматах показали, что адаптивный перенос Т-клеток обеспечивает значительный уровень защиты от инфекции SARS-CoV-2 и приводит к менее тяжелому исходу заболевания (McMahan et al., 2021). Роль Т-клеток также была показана у мышей: в отсутствие антител Т-клетки были способны устранять инфекцию SARS-CoV, а иммунизация одним иммунодоминантным эпитопом CD8⁺ Т-клеток защищала от летального исхода заболевания (Channarpanavar et al., 2014; Zhao et al., 2010).

Все больше доказательств указывает на клиническую важность Т-клеток при COVID-19 и у людей. Так, раннее появление специфичных к SARS-CoV-2 Т-клеток, секретирующих IFN γ , было связано с протеканием заболевания в легкой форме (Tan et al., 2020b). Ответ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток способствуют снижению тяжести заболевания (Liao et al., 2020; Rydyznski Moderbacher et al., 2020). Анергия же Т-клеток, напротив, связана с плохим прогнозом (Renner et al., 2021). В некоторых случаях ранее существовавшие специфичные к антигенам SARS-CoV-2 Т-клетки могут даже предотвратить развитие полномасштабного заболевания (Swadling et al., 2022; Titov et al., 2022). Сниженное разнообразие Т-клеточного ответа характерно для пациентов с пневмонией COVID-19 (Chang et al., 2019), а уменьшение количества CD8⁺ Т-клеток указывает на высокую вероятность развития тяжелого заболевания и даже смерти (Wang et al., 2020a).

Доказательством того, что Т-клетки вносят большой вклад в выздоровление от COVID-19, также служат пациенты с различными иммунными

патологиями, у которых, несмотря на отсутствие В-клеток и/или антител, наблюдалось формирование Т-клеточного иммунитета и последующее выздоровление (Asplund Högelin et al., 2021; Bange et al., 2021; Hughes et al., 2021; Jones et al., 2021). Однако важно отметить, что такие пациенты имели более высокие показатели смертности после инфекции SARS-CoV-2 (Patel et al., 2022). Вирус-специфичные Т-клетки обнаруживаются и у здоровых людей, перенесших заболевание без образования антител (Bonifacius et al., 2021; Schwarzkopf et al., 2021). Более того, в крупном проспективном исследовании нами было показано, что подгруппа пациентов, у которых отсутствовал гуморальный ответ на SARS-CoV-2, тем не менее, была частично защищена от инфекции Т-клетками (Molodtsov et al., 2022).

1.2.4. Иммунный ответ CD8⁺ Т-клеток при COVID-19

Во многих исследованиях было показано, что при тяжелой форме COVID-19 происходит изменение активации и/или дифференцировки CD8⁺ Т-клеток, что порождает несколько важных фундаментальных вопросов: 1) как ответ CD8⁺ Т-клеток связан с тяжестью заболевания; 2) отражает ли ответ Т-клеток в периферической крови события в дыхательных путях; 3) являются ли ответы CD8⁺ Т-клеток антиген-специфичными.

Многочисленные исследования показали гетерогенность иммунного ответа на SARS-CoV-2, в том числе в отношении CD8⁺ Т-клеток, а новые данные указывают на формирование разнообразных иммунотипов у пациентов с различными особенностями течения заболевания (Mathew et al., 2020). Так, имеются данные, говорящие о том, что при тяжелой форме заболевания Т-клетки приобретают фенотипы терминальной дифференцировки или истощения, для которых характерно увеличение уровней экспрессии молекул иммунологических контрольных точек PD1, TIM3, LAG3, CTLA4, NKG2A и CD39 (Mathew et al., 2020; Zheng et al., 2020). Однако экспрессия этих молекул также может свидетельствовать о недавней активации, поэтому остается неясным, истощены ли Т-клетки у пациентов с COVID-19 или просто сильно

активированы. При этом в других исследованиях можно найти результаты, которые, напротив, говорят о гиперактивации CD8⁺ Т-клеток, высоком уровне экспрессии маркеров, связанных с естественными киллерами, и повышенной цитотоксичности (Kuri-Cervantes et al., 2020; Zheng et al., 2020). Также у некоторых пациентов может наблюдаться увеличение количества CD38⁺HLA-DR⁺ активированных CD8⁺ Т-клеток или Ki67⁺ пролиферирующих CD8⁺ Т-клеток (Kuri-Cervantes et al., 2020; Mathew et al., 2020). Активированные CD38⁺HLA-DR⁺ или Ki67⁺ CD8⁺ Т-клетки, которые присутствуют в крови во время острой фазы заболевания или после введения живой ослабленной вакцины, также содержат популяции вирус-специфичных Т-клеток, что говорит о направленном противовирусном ответе (Miller et al., 2008). Однако не для всех пациентов характерен такой тип активации Т-клеток: есть пациенты, у которых происходит слабая активация Т-клеточного звена, что предполагает другие паттерны ответа CD8⁺ Т-клеток (Mathew et al., 2020).

Исследования аутопсии и данные секвенирования клеток из жидкости бронхоальвеолярного лаважа говорят о наличии там иммунного ответа CD8⁺ Т-клеток (Wichmann et al., 2020). В верхних дыхательных путях происходят взаимодействия между эпителиальными клетками и цитотоксическими Т-лимфоцитами опосредованные, в частности, секрецией IFN γ (Chua et al., 2020). Сильная клональная экспансия CD8⁺ Т-клеток в периферической крови или жидкости бронхоальвеолярного лаважа может быть связана с более легким течением заболевания или выздоровлением, хотя неясно, является ли это причиной или следствием выздоровления при заболевании (Wen et al., 2020).

Наконец, имеются данные о наличии специфичных к эпитопам SARS-CoV-2 CD8⁺ Т-клетках у выздоровевших пациентов, что свидетельствует не только о специфическом иммунном ответе, но и о формировании CD8⁺ Т-клеток памяти у многих выздоровевших пациентов (Grifoni et al., 2020; Peng et al., 2020). Точная роль этих CD8⁺ Т-клеток в развитии инфекции SARS-CoV-2 и их способность защищать от повторных заражений еще предстоит определить.

1.2.5. Иммуный ответ CD4+ Т-клеток при COVID-19

Так же, как и для цитотоксических Т-клеток, для CD4+ Т-хелперных клеток характерно повышение экспрессии маркеров активации и/или истощения у пациентов с COVID-19 (Diao et al., 2020; Mazzoni et al., 2020). Однако большинство данных говорит о том, что активация CD8 + Т-клеток может быть более выраженной, чем активация CD4+ Т-клеток, по крайней мере по таким маркерами активации, как CD38 и HLA-DR (Qin et al., 2020; Thevarajan et al., 2020). При этом высокий уровень активации CD4+ Т-клеток был характерен для пациентов с более тяжелым течением заболевания (Mathew et al., 2020). Также для пациентов с тяжелым течением заболевания, по сравнению с пациентами с заболеванием средней тяжести, характерна более высокая доля IFN γ -продуцирующих Т-хелперов 1 типа (Th1) (Chen et al., 2020). Роль Т-хелперов 2 типа (Th2) при тяжелом течении COVID-19 неясна, хотя для пациентов с легким течением заболевания изменение в этой популяции клеток обнаружено не было (Laing et al., 2020). Учитывая ключевую роль ответа Th2-клеток при других респираторных заболеваниях, это важная область для дальнейшего изучения. Еще одним типом клеток, вовлеченных в ответ при тяжелой форме COVID-19, являются Т-хелперы 17 (Th17): для них характерно увеличение экспрессии маркера CCR6+ (Qin et al., 2020).

Лимфопения также затрагивает CD4+ Т-клетки, хотя некоторые исследования предполагают, что это воздействие меньше, чем на CD8+ Т-клетки (Mathew et al., 2020). У пациентов, выздоровевших от инфекции SARS-CoV-2, формируются специфичные к вирусу CD4+ Т-клетки памяти (Grifoni et al., 2020; Neidleman et al., 2020) с высоким уровнем экспрессии IL-7Ra (Neidleman et al., 2020). Интересно, что CD4+ Т-клетки памяти также обнаруживаются у людей, которые никогда не контактировали с вирусом SARS-CoV-2 (Grifoni et al., 2020). Остается неясным, являются ли эти клетки кросс-реактивными и сформированными ранее в ответ на инфицирование эндемичными коронавирусами, и влияют ли они на течение COVID-19.

1.2.6. Т-клеточная память при COVID-19

Клеточный иммунный ответ, по-видимому, сохраняется дольше, чем антительный IgG-опосредованный ответ. Т-клетки сохраняются у выздоровевших пациентов, по крайней мере, в течение 6-8 месяцев (Bilich et al., 2021; Dan et al., 2021; Sherina et al., 2021), а согласно последним данным и до 10-15 месяца после заболевания (Marcotte et al., 2022). Подобная динамика снижения Т-клеточного ответа характерна и для других вирусов, таких как желтая лихорадка (Dan et al., 2021). Время “полужизни” CD8+ Т-клеток памяти равняется 190 дням, в то время как для CD4+ Т-клеток оно составляет 64 дня (Dan et al., 2021).

Ключевой вопрос заключается в том, могут ли Т-клетки памяти, сформировавшиеся после инфекции SARS-CoV-2 или вакцинации, обеспечить защиту от повторного заражения. Несмотря на то, что данные об эффективности вакцинации еще предстоит получить, исследования защитной роли Т-клеток памяти у переболевших выглядят многообещающими. Так, CD4+ и CD8+ Т-клетки памяти были обнаружены у 100% и 70% выздоровевших пациентов, соответственно (Grifoni et al., 2020). Т-клетки памяти формируются не только на S, М и N белки, но и на другие белки SARS-CoV-2 (Peng et al., 2020). Хотя количество циркулирующих Т-клеток со временем уменьшается (Wheatley et al., 2021; Marcotte et al., 2022), эти клетки сохраняют способность секретировать цитокины (Kang et al., 2021) и пролиферировать при повторной стимуляции соответствующим антигеном (Rodda et al., 2021).

После иммунизации вакцинами на основе вирусной мРНК также образуются CD4+ и CD8+ Т-клетки памяти. Однако их количество в периферической крови существенно сокращается в течение первых 3 месяцев (Goel et al., 2021), что, тем не менее, соответствует тому, что было показано для других острых вирусных инфекций у людей (Rickinson et al., 2014; Berg van den et al., 2021). Вслед за этим в крови формируется пул относительно стабильных CD4+ Т-клеток памяти, включающих в основном фенотипы Т-клеток

центральной памяти (T_{CM}) и эффекторных Т-клеток памяти (T_{EM}). Уровень T_{fh} быстро снижается в течение 6 месяцев после вакцинации мРНК, что согласуется с исследованиями, показывающими временный характер появления клеток с таким фенотипом в периферической крови после иммунизации против гриппа. Это, возможно, отражает их миграцию в лимфатические узлы.

В целом, все эти данные четко демонстрируют формирование долгоживущих популяций $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клеток памяти после заболевания или вакцинации против COVID-19. Тем не менее, остается неясным, обеспечивают ли эти Т-клетки защитный иммунитет. Однозначно ответить на этот вопрос мешает наличие антител, специфичных к SARS-CoV-2 у пациентов. Кроме того, важно определить, как формируется пул Т-клеток памяти у пациентов, которые испытывают легкие симптомы COVID-19, по сравнению с тяжелым заболеванием.

1.2.7. Антигенная специфичность иммунного ответа

Мы и другие исследователи идентифицировали множество различных иммуногенных эпитопов SARS-CoV-2, рестрицированных HLA I и II классов (Ferretti et al., 2020; Shomuradova et al., 2020; Gangaev et al., 2021; Kared et al., 2021; Nelde et al., 2021; Saini et al., 2021). Для определения специфичных к SARS-CoV-2 Т-клеток в ранних исследованиях использовался набор пептидов SARS-CoV-2 для стимуляции мононуклеарных клеток периферической крови у пациентов с COVID-19 (Grifoni et al., 2020; Patel et al., 2022). Используя маркеры активации $CD69^+CD137^+$ для $CD8^+$ Т-клеток и $OX40^+CD137^+$ для $CD4^+$ Т-клеток, было показано, что у 70%-100% пациентов с COVID-19 обнаруживаются клетки, специфичные к пептидам из S, M, N, ORF белков как в острой фазе заболевания (Weiskopf et al., 2020), так и после выздоровления (Grifoni et al., 2020). Кроме того, стимуляция перекрывающимися пулами пептидов SARS-CoV-2 лимфоцитов *in vitro* также приводила к клональной экспансии специфичных $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-клеток у пациентов после COVID-19 и продукции этими клетками $IFN\gamma/TNF$ (Habel et al., 2020).

Специфичные к антигенам SARS-CoV-2 Т-клетки также были обнаружены у >20% индивидуумов, никогда не контактировавших с вирусом, что указывает на некоторый уровень перекрестной реактивности с Т-клетками, специфичными к сезонным коронавирусам HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-NKU116 или другим патогенным микроорганизмам. Подтверждением этого может служить тот факт, что перекрестно-реактивные Т-клетки в основном имели фенотип клеток памяти (Bert le et al., 2020; Grifoni et al., 2020; Weiskopf et al., 2020). Однако в других работах такой сильной перекрестной активации обнаружено не было, что может объясняться различной чувствительностью и специфичностью использованных методов детекции. Некоторые эпитопы, такие как SPRWYFYYL_{N105-113} (SPR), KPRQKRTAT_{N257-265} (KPR) и QYIKWPWYI_{S1208-1217} (QYI), демонстрировали наибольший уровень потенциальной перекрестной активации. Окрашивание специфичными к этим эпитопам МНС-тетрамерами CD8⁺ Т-клеток из образцов, биобанкированных до пандемии, выявило скорее наивный фенотип предсуществующих CD8⁺ Т-клеток у детей, взрослых и пожилых людей (Habel et al., 2020; Peng et al., 2020; Nguyen et al., 2021).

В последующих исследованиях для идентификации эпитопов CD8⁺ Т-клеток, специфичных для SARS-CoV-2, использовали более чувствительный метод - окрашивание пептид-МНС-тетрамерами (Habel et al., 2020; Peng et al., 2020). Обнаружение эпитопов CD8⁺ Т-клеток, таких как YTVVEAKTV_{ORF1a1637-1646}, KTFPPTPEP_{N362-370}, MEVTPSGTWL_{N322-331}, YLQPRTFLL_{S269-277} (YLQ), а также QYI и SPR, позволило изучить величину эпитоп-специфичного ответа, происхождение специфичных Т-клеток и их фенотип непосредственно *ex vivo* (Nguyen et al., 2021). Количество специфичных к SARS-CoV-2 CD8⁺ Т-клеток *ex vivo* во время острой фазы заболевания или непосредственно после выздоровления варьируется в широких пределах: в диапазоне от 10⁻⁵ до 10⁻¹ у некоторых доноров для определенных эпитопов (Gangaev et al., 2021). Одним из наиболее иммунодоминантных эпитопов является эпитоп SPR из N- белка, представляющийся в аллеле HLA-B*07:02 (Nguyen et al., 2021; Peng et al., 2022).

Иммунодоминантность SPR по сравнению с другими эпитопами CD8⁺ Т-клеток, включая KPR, YLQ и QYI, была обеспечена высокой частотой наивных предшественников в образцах детей, взрослых и пожилых людей до пандемии. В такое большое количество наивных предшественников SPR вносит вклад весьма разнообразный репертуар ТКР $\alpha\beta$, обусловленный высоким разнообразием сегментов генов TRAV, TRAJ, TRBV или TRBJ в эпитоп-специфичных ТКР (Nguyen et al., 2021). Интересно отметить, что у пациентов с легким течением заболевания был обнаружен значительный SPR-специфичный ответ CD8⁺ Т-клеток, характеризующийся большим количеством клонов ТКР с высокой функциональной авидностью и противовирусными эффекторными функциями, в то время как у пациентов с тяжелым течением заболевания были более слабые ответы CD8⁺ Т-клеток на SPR. Из этого можно предположить, что SPR-специфичные CD8⁺ Т-клетки способствуют контролю заболевания (Peng et al., 2022). Помимо этого, было показано, что SPR-специфичные CD8⁺ Т-клетки могут также реагировать на другие штаммы коронавируса, включая “вызывающие озабоченность” варианты. Эти результаты подтверждают предыдущие исследования на животных и людях, согласно которым разнообразие репертуара ТКР играет ключевую роль в формировании высокоавидных репертуаров, важных для защиты как от повторного заражения вирусом дикого типа, так и от других штаммов.

В ряде публикаций сообщалось о последовательностях Т-клеточных рецепторов, распознающих и другие иммунодоминантные эпитопы SARS-CoV-2 (Shomuradova et al., 2020; Snyder et al., 2020; Minervina et al., 2022). Было продемонстрировано, что ТКР, специфичные для некоторых из них, являются публичными (Shomuradova et al., 2020; Nguyen et al., 2021; Simnica et al., 2021) и имеют высокую степень взаимного сходства, что иногда характеризуется сильными смещением в использовании определенных V-и J- сегментов в процессе рекомбинации при перестройке локуса рецептора. Согласно данным о структуре ТКР, такое уменьшение разнообразия может быть объяснено

распознаванием эпитопов с использованием участков, кодируемых в зародышевой линии (Wu et al., 2022). Так, было продемонстрировано, что CD8⁺ Т-клетки, специфичные к эпитопу YLQ, несмотря на его выраженную иммунодоминантность, обнаруживаются в значительно меньшем количестве в крови по сравнению с SPR-специфичными Т-клетками (Shomuradova et al., 2020; Nguyen et al., 2021). Это может быть связано с менее разнообразным репертуаром ТКР, распознающих этот эпитоп: для него характерно более частое использование TRBV2/TRBV7-9/TRBV20-1, TRBJ2-2/TRBJ2-7, TTRAV12-1/TRAV12-2/TRAV14/DV4 и TRAJ43/TRAJ30 (Chaurasia et al., 2021).

Тетрамер-специфичные CD8⁺ Т-клетки *ex vivo* демонстрировали преимущественно фенотип T_{cm} (Nguyen et al., 2021) и оставались стабильны до 270 дней после начала заболевания, при этом происходило незначительное увеличение популяции терминально дифференцированных эффекторных Т-клеток памяти (TEMRA). Иммунодоминантные SPR-специфичные CD8⁺ Т-клетки также оставались на детектируемом уровне через 270 дней после начала заболевания (Nguyen et al., 2021).

В то время как эпитопы CD8⁺ Т-клеток, специфичные для SARS-CoV-2, представляющиеся в наиболее распространенных HLA I класса, достаточно хорошо исследованы, эпитопы CD4⁺ Т-клеток изучены недостаточно (отчасти из-за технической сложности получения тетрамеров для HLA II класса). Тем не менее, были идентифицированы участки, включая SFIEDLLFNKVTLAD_{S816-830}, IAQYTSAL_{S870-878} и TFEYVSQPFLMDL_{S167-180}, которые вызывают иммунный ответ у многих доноров (Loyal et al., 2021; Lu et al., 2021). В целом, в настоящее время имеется достаточно доказательств того, что Т-клетки играют роль в ограничении тяжести COVID-19 и выздоровлении после инфекции SARS-CoV-2, особенно у лиц с ослабленным иммунитетом, у которых не детектируются В-клетки и/или антитела.

Антиген-специфичные Т-клетки формируются не только после заболевания, но также и после вакцинации. При сравнении иммунного ответа

после заражения или вакцинации, было показано, что Т-клетки, реагирующие на эпитопы, полученные из S-белка, демонстрируют сходную силу ответа, фенотип Т-клеток памяти, разнообразие репертуара ТКР и мотивы последовательностей ТКР $\alpha\beta$. У доноров, выздоровевших от COVID-19, и лиц, получавших вакцину впоследствии, ранее существовавшие S-специфичные клетки памяти демонстрировали как клональную экспансию, так и фенотипический сдвиг в сторону более дифференцированных эффекторных клеток фенотипа CCR7-CD45RA⁺ в ответ на введение вакцины. Углубленный анализ репертуара Т-клеточных рецепторов продемонстрировал, что как вакцинация, так и инфекция вызывают формирование в значительной степени идентичных репертуаров, что указывает на то, что вакцинация вызывает Т-клеточный иммунный ответ, аналогичный с естественным заражением по всем критическим параметрам (Minervina et al., 2022).

1.2.8. Кросс-реактивный иммунный ответ

Течение COVID-19 варьируется от полностью бессимптомного и легкого заболевания до тяжелых и даже летальных форм. Множество различных факторов вносят вклад в риск развития тяжелой формы; основными детерминантами являются пол, этническая принадлежность, здоровье и возраст. Однако демографические особенности лишь частично объясняют различия в показателях смертности от инфекций между странами (O'Driscoll et al., 2021). Другими важными факторами могут быть особенности климата (например, температура и влажность) и связанные с ними сезонные вспышки заболевания, стратегии лечения, уровень вакцинации, а также множество других, возможно, неизвестных факторов (Gaunt et al., 2010; Moriyama et al., 2020; Walker et al., 2020).

Интересной когортой людей являются те, которые не заболели, находясь в тесном контакте с инфицированными (Titov et al., 2022). Одной из гипотез, объясняющих эту особенность, может быть гипотеза о наличии кросс-реактивного иммунного ответа, сформированного эндемическими

коронавирусными инфекциями (Bert le et al., 2020; Mateus et al., 2020), которые циркулировали в большинстве стран мира еще до пандемии COVID-19 (Su et al., 2016) и, как правило, носили сезонный характер (Neher et al., 2020). Для проверки гипотезы о кросс-реактивном ответе были проведены многочисленные исследования гуморального (Lv et al., 2020; Ng et al., 2020; Ladner et al., 2021) и Т-клеточного ответа (Bert le et al., 2020; Grifoni et al., 2020; Peng et al., 2020; Weiskopf et al., 2020; Nelde et al., 2021) в образцах здоровых людей, собранных до пандемии COVID-19. В совокупности эти результаты свидетельствуют о высокой степени перекрестной активации как антител, так и Т-клеток. Тем не менее, кросс-реактивный ответ не может полностью объяснить отсутствие симптомов болезни, поскольку более половины иммуногенных эпитопов из SARS-CoV-2 не имеют гомологов ни в одном из эндемичных коронавирусов (Tan et al., 2021).

На сегодняшний день также остается неясным, влияет ли наличие перекрестного иммунитета у здоровых людей на тяжесть протекания COVID-19 (Gombar et al., 2021; Sagar et al., 2021). Было показано, что HCoV-реактивные Т-клетки обладают низкой функциональной авидностью по отношению к SARS-CoV-2 (Bacher et al., 2020), хотя другие исследования предполагают, что предсуществующие Т-клетки, специфичные к РНК-полимеразе коронавируса, являются предиктором бессимптомного течения заболевания (Swadling et al., 2022). Таким образом, можно сказать, что кросс-реактивный иммунитет с эндемичными HCoV может частично объяснить различия в показателях смертности от COVID-19 в разных частях мира (Yaqinuddin, 2020) и что высокая заболеваемость простудными заболеваниями у детей и подростков может способствовать их заметно более низкому риску развития тяжелых форм заболевания (Ng et al., 2020).

Не только кросс-реактивный ответ на сезонные коронавирусы может иметь позитивное влияние на протекание заболевания. Т-клетки памяти, сформировавшиеся в результате инфекции, вакцинации или инфекции и

вакцинации, способны реагировать как на изначальный штамм SARS-CoV-2, так и на новые штаммы (Goel et al., 2021). Высокая трансмиссионная способность SARS-CoV-2 и медленные темпы вакцинации привели к образованию других, так называемых “вызывающих озабоченность” штаммов, включающих варианты Alfa (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529). Эти варианты оказались менее восприимчивы к нейтрализующим антителам в сыворотках крови вакцинированных и переболевших доноров (Alter et al., 2021; Cele et al., 2021; Tegally et al., 2021), хотя функциональная активность Т-клеток и уровень S-связывающих антител сохраняются (Geers et al., 2021; Keeton et al., 2021; Riou et al., 2022). Большая устойчивость Т-клеточного ответа к мутациям вируса вызвана большим разнообразием и изменчивостью эпитопов, распознаваемых у разных людей. Тем не менее, в некоторых Т-клеточных эпитопах происходят несинонимичные мутации, приводящие к уменьшению связывания пептида и МНС или снижению способности активировать Т-клетки (Agerer et al., 2021; Wu et al., 2022). Однако эти мутации лишь в редких случаях фиксируются в “вызывающих озабоченность” вариантах, что, вероятно, связано с тем, что варианты эпитопов, уходящие от презентации одной аллелью HLA, часто становятся презентуемыми в других аллелях (Nersisyan et al., 2022). Вирусные доминантные эпитопы CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток, упомянутые ранее, как правило оставались не мутированы в “вызывающих беспокойство” вариантах, и специфичные к ним клетки сохраняли способность реагировать на штаммы Delta и Omicron (Peng et al., 2022). В частности, штамм Omicron вызывал специфичный иммунный ответ на эпитопы как из S-белка (YLQ; QYIKWPWYI_{S1208-1217}; TFEYVSQPFLMDLE_{S167-180}), так и из других белков (TTDPSFLGRY_{ORF1a1637-1646}; KTFPPTEPK_{N361-369}; SPR; MEVTPSGTWL_{N322-331}), то есть ранее существовавшие Т-клетки памяти, сформированные в результате инфекции SARS-CoV-2 и/или вакцинации, могут быть рекрутированы в иммунный ответ при заражении штаммом Omicron у значительной части населения (Gao et al., 2022; GeurtsvanKessel et al., 2022; Keeton et al., 2022). Ответы Т-клеток,

индуцированные современными вакцинами Ad26.CoV2.S и BNT162b2 SARS-CoV-2, были высоко перекрестно реактивными и формировали иммунный ответ, защищавший также и от Omicron, Delta и Beta штаммов. Как правило, $\approx 70-80\%$ CD8⁺ Т-клеток, специфичных к дикому типу SARS-CoV-2, также реагировали на Omicron. Naranbhai и его коллеги изучили инфицированных SARS-CoV-2, вакцинированных, инфицированных и впоследствии вакцинированных, а также ревакцинированных доноров, чтобы выявить Т-клетки, обладающие перекрестной специфичностью к пептидам из различных белков Omicron (Naranbhai et al., 2022). Бустерная вакцинация усиливала реакцию Т-клеток на вариант Omicron. Удивительно, но у 21% индивидуумов реакция Т-клеток на пептиды, полученные из S-белка штамма Omicron, была ниже более чем на 50% по сравнению с реакцией на пептиды из S-белка изначального штамма. Аналогично, Keeton et al. было показано, что у 15% как переболевших, так и вакцинированных людей CD8⁺ Т-клетки потеряли способность реагировать на эпитопы из штамма Omicron (Keeton et al., 2022). При этом вакцинация обеспечивает более надежную защиту от новых штаммов по сравнению с естественным заболеванием. Так, CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки, специфичные к S-белку SARS-CoV-2, появившиеся благодаря предшествующей инфекции или вакцинации, обеспечивали хороший уровень защиты от Omicron, при этом средняя частота S-специфичных CD4⁺ Т-клеток SARS-CoV-2, которые распознают Omicron, составили 84% для ранее инфицированных и 91% для вакцинированных, а для S-специфичных CD8⁺ Т-клеток - 70% и 92%, соответственно (Gao et al., 2022). Перекрестный Т-клеточный иммунный ответ можно было обнаружить у доноров даже через год после заражения при отсутствии нейтрализующих антител (Guo et al., 2022). В случае штамма Beta было показано, что мутации в вирусе вызывали снижение перекрестного ответа антител, но не затрагивали Т-клеточные эпитопы (Guo et al., 2022).

Таким образом, в то время как большая часть населения уже имеет Т-клетки, способные защищать от новых штаммов, таких как Omicron, у некоторых

людей, вероятно, из-за особенностей набора аллелей HLA, в них представляются неконсервативные пептиды, которые более подвержены мутациям. Следовательно, такие люди имеют сниженный защитный иммунитет. Однако тяжелое заболевание, по-видимому, относительно редко встречается у таких людей, что подчеркивает потенциальную роль других компонентов адаптивной иммунной системы.

1.3. Репертуар Т-клеточных рецепторов

Т-клетки являются центральным звеном адаптивного иммунитета. Их способность распознавать антиген в виде коротких пептидных последовательностей в контексте главного комплекса гистосовместимости (МНС), и изучение репертуара Т-клеточных рецепторов важно для понимания логики иммунного ответа на различные инфекционные агенты, включая вирус SARS-CoV-2.

1.3.1. Структурное разнообразие ТКР, определяющее специфичность к антигену

Структура большинства рецепторов Т-клеток человека представляет собой связанный дисульфидом гетеродимер, каждая цепь которого состоит из константного и переменного доменов. Гетеродимер может быть образован из γ/δ субъединиц, характерных для небольшой (0.5 - 5%) популяции Т-клеток, или α/β субъединиц, формирующих ТКР большинства Т-клеток.

Последовательность ТКР образуются путем соматических перестроек сегментов трех классов: V (от англ. variable), J (от англ. joining) и, в случае перестройки тяжелой цепи, D (от англ. diversity) со случайным добавлением или удалением нуклеотидов (Bassing et al., 2002). В результате образуется огромное количество уникальных ТКР, в контексте которых выделяют гипервариабельные участки (CDR). Процесс V(D)J рекомбинации приводит к тому, что CDR 1 и 2 типов полностью кодируются в ДНК зародышевой линии, тогда как CDR3 α и β

цепей ТКР формируются из разнообразных генов и, следовательно, являются наиболее изменчивыми.

Связывание между ТКР и пептидом, представляемым в контексте МНС, имеет относительно низкое сродство (Gálvez et al., 2019); многие ТКР распознают один и тот же пептид, а многие пептидные антигены распознаются одним и тем же ТКР (Bagaev et al., 2020). Обычно в процессе распознавания антигена CDR1 α , CDR1 β , CDR2 α и CDR2 β контактируют с МНС, в то время как CDR3 α и CDR3 β непосредственно взаимодействуют с пептидом (Sharon et al., 2016). Однако в принципе, каждый из шести CDR (по 3 на каждой из двух цепей ТКР) также может быть вовлечен в распознавание антигена, например, пептид SARS-CoV-2 YLQPRTFLL распознается преимущественно за счет CDR2 α и CDR2 β (Wu et al., 2022)

1.3.2. Специфичность кластеризации ТКР, основанной на сходстве последовательностей

Предсказание эпитопов, распознаваемых репертуаром Т-клеток, по последовательностям ТКР остается одним из нерешенных вопросов иммунологов и биоинформатиков. Идентификация ТКР при помощи секвенирования репертуаров позволила обнаружить паттерны рецепторов, которые могут определять специфичность к антигену или клинический исход. Недавние исследования показали, что можно вывести общие закономерности среди последовательностей ТКР, взаимодействующих с одним и тем же эпитопом (Dash et al., 2017; Glanville et al., 2017), открывая перспективу прогнозирования специфичности *in silico* и оценки разнообразия и сложности репертуаров ТКР, полученных экспериментально.

Для оценки сходства ТКР строят графы, отражающие степень схожести их CDR3 α или CDR3 β . Наиболее схожие между собой последовательности формируют кластеры. В качестве критерия схожести, как правило, берут какую-то меру расстояния, например, расстояние Левенштейна (Logan et al., 2022) или Хэмминга (Valkiers et al., 2021). Другой способ был предложен Dash и коллегами

(Dash et al., 2017). Они ввели количественную меру сходства, где “вес” каждой замены в CDR1, 2 и 3 определялся на основе матрицы замещения BLOSUM62 со “штрафом” за изменение длины CDR. Следует отметить, что последовательности CDR3, как правило, придают больший вес из-за ее заметной роли в связывании эпитопов. Благодаря этим различным аналитическим инструментам, основанным на определении расстояния между двумя ТКР, было обнаружено, что репертуары ТКР часто содержат доминирующие кластеры, сходство последовательностей которых частично обусловлено использованием общих V- и J-генов, а также сходством мотивов CDR3. Более того, каждый эпитоп-специфичный репертуар включает кластеризованную группу рецепторов с сильным сходством последовательностей, а также различные некластеризованные рецепторы.

1.3.3. Количественная оценка клональности, разнообразия и сходимости репертуаров ТКР

Помимо разнообразия в антигенной специфичности репертуаров Т-клеток, разнообразие клонотипов может отражать способность Т-клеточного клона к иммунному ответу во время развития заболевания или в ответ на лечение. Были созданы многочисленные вычислительные алгоритмы, анализирующие последовательности ТКР и характеризующие клональность репертуара (Greiff et al., 2015). Широкое структурное разнообразие, характеризующее ТКР, затрудняет анализ репертуаров иммунных клеток, но позволяет отслеживать различные ТКР в разных тканях (периферическая кровь, опухолевая ткань, прилегающая нормальная ткань и т.д.) в разные временные точки в исследованиях иммунного профилирования. В последние годы исследовательские группы сосредоточили свое внимание на анализе динамики репертуара ТКР как показателя иммунного ответа при воспалительных заболеваниях, таких как рассеянный склероз (Alves Sousa et al., 2019), аутоиммунных заболеваниях (Chang et al., 2019), вирусных инфекциях (Krummey et al., 2020) или онкологических заболеваниях (Reuben et al., 2020), а также как

биомаркера ответа на иммунотерапию (Valpione et al., 2020). Состав и разнообразие репертуара ТКР являются важными факторами, определяющими исход заболевания вирусной инфекцией. Многочисленные исследования предоставили четкие доказательства, указывающие на то, что весьма разнообразный репертуар ТКР обеспечивает защиту от широкого спектра антигенов (Miconnet et al., 2011; Dash et al., 2017). Вполне возможно, что высокое разнообразие репертуара ТКР может обеспечить необходимый уровень avidности, аффинности и общей функциональности (Price et al., 2005; Zehn et al., 2009).

1.3.4. Т-клеточный репертуар при SARS-CoV-2

Недавние исследования показали, что специфичный для SARS-CoV-2 репертуар имеет свою собственную архитектуру, отличается в зависимости от тяжести заболевания и меняется с течением времени. Интересной особенностью репертуара является то, что в большинстве случаев частота Т-клеток, специфичных к эпитопам SARS-CoV-2, сравнительно низка (Habel et al., 2020; Shomuradova et al., 2020), хотя для некоторых эпитопов она может варьироваться в диапазоне от 10^{-5} до 10^{-1} во время острой фазы и сразу после выздоровления (Gangaev et al., 2021). Низкая частота Т-клеток памяти не коррелирует с иммунодоминантностью эпитопа (Habel et al., 2020; Shomuradova et al., 2020): так CD8⁺ Т-клетки, специфичные к высокоиммуногенному эпитопу YLQ, обнаруживаются в крови в довольно низких количествах (Shomuradova et al., 2020; Nguyen et al., 2021). Тем не менее, скромный размер репертуара может быть связан с тяжелым заболеванием, в то время как разнообразие репертуара Т-клеток вносит большой вклад в успешную элиминацию вируса (Chang et al., 2021; Salomé et al., 2021). Разнообразие ТКР у людей во время инфекции COVID-19 снижается по сравнению со здоровыми донорами (Park et al., 2021; Wang et al., 2022), при этом люди с тяжелой формой заболевания имеют еще менее разнообразный репертуар ТКР по сравнению с пациентами с легкой формой заболевания (Chang et al., 2021). Это может объяснить высокую вероятность

развития серьезного заболевания и смерти у пожилых пациентов (Grasselli et al., 2020; Wu et al., 2020), поскольку хорошо известно, что разнообразие репертуара ТКР уменьшается с возрастом, что также влияет на иммунный ответ на другие вирусные инфекции, например, ответ на вирус гриппа А (Gil et al., 2015; Nguyen et al., 2018).

SARS-CoV-2 -специфичный репертуар также характеризуется публичностью, т.е. во время инфекции у различных людей в крови могут экспандироваться клоны из наивных предшественников с одинаковым рецептором (Shomuradova et al., 2020; Minervina et al., 2022; Wang et al., 2022). Такие клонотипы, как правило, имеют короткую область CDR3 и высокую вероятность V(D)J-рекомбинации (Pogorelyu et al., 2018). Считается, что такие клонотипы играют важную роль в эффективном иммунном ответе на патоген и контроле инфекции (Zhao et al., 2016). Подтверждением этого является тот факт, что у пациентов с пневмонией преобладали CDR3 с более низкой вероятностью V(D)J-рекомбинации, в то время как у пациентов с легкой формой заболевания ассоциированные с SARS-CoV-2 кластеры ТКР состояли преимущественно из CDR3 с высокой вероятностью рекомбинации, и большинство из них были публичными (Chang et al., 2021; Park et al., 2021). Однако то, насколько разнообразие и/или размер репертуара влияют на длительность персистенции Т-клеток памяти остается малоизученным вопросом.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Методы работы с эукариотическими клетками

2.1.1. Доноры

В этом исследовании добровольно приняли участие 50 доноров, перенесших вирусную инфекцию COVID-19 (ПД). Факт инфицирования был подтвержден положительным ПЦР - тестом на вирус SARS-CoV-2. Все доноры подписали форму информированного согласия, утвержденную этическим комитетом Национального Медицинского Исследовательского Центра Гематологии (N 150, 02.07.2020). Тяжесть заболевания определялась в соответствии классификацией, используемой Национальными Институтами Здравоохранения Соединенных Штатов Америки (www.covid19treatmentguidelines.nih.gov). В соответствии с классификацией доноры делились на тех, кто перенес заболевание бессимптомно - отсутствие симптомов (n=2), с легкой степенью тяжести: лихорадка, кашель, боль в мышцах, но без затруднения дыхания или аномалий, выявленных на компьютерной томографии легких (n = 31) и со средней формой течения заболевания: поражение нижних дыхательных путей, обнаруживаемое при компьютерной томографии, сатурация легких не менее 94% (n = 17). В выборке не было людей, перенесших заболевание в тяжелой форме: ни один из доноров не нуждался в лечении в отделении интенсивной терапии или в вентиляции легких. Выборка была сбалансирована по возрасту и полу: в нее вошли 27 женщин и 23 мужчины возрастом от 17 до 64 лет (медианный возраст составлял 36 лет). Образцы крови брались методом венепункции. Забор периферической крови доноров осуществлялся 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). Никто из доноров не был вакцинирован от COVID-19

и не имел подтвержденного повторного заражения в период между взятием образцов крови.

В исследовании было использовано 19 образцов здоровых доноров (ЗД): 14 из них были взяты из банка крови Национального Медицинского Исследовательского Центра Гематологии (криоконсервированных не позднее августа 2019 года) с одобрения местного этического комитета, и еще 5 образцов были получены от здоровых доноров во время пандемии COVID-19 (критериями включения были отсутствие симптомов и отрицательные результаты ПЦР-теста на всем протяжении времени с момента начала пандемии COVID-19 до взятия образца крови; четверо из этих доноров впоследствии заразились, и их образцы после перенесения инфекции были включены в когорту переболевших).

Детальная характеристика доноров приведена в **Таблице 1**.

Таблица 1. Информация о переболевших и здоровых донорах, рекрутированных в исследование.

Группа	№ донора	Пол	Возраст, лет	BT1, дни	BT2, дни	Тяжесть заболевания
ПД	p1426	М	17	21	209	Легкая
ПД	p1428	Ж	47	25	213	Легкая
ПД	p1436	Ж	29	25	200	Легкая
ПД	p1437	М	28	25	251	Легкая
ПД	p1445	М	32	33	211	Легкая
ПД	p1446	Ж	36	25	193	Легкая
ПД	p1447	Ж	59	34	204	Легкая
ПД	p1448	М	37	30	217	Средняя
ПД	p1452	Ж	19	40	208	Легкая
ПД	p1463	М	38	35	202	Средняя
ПД	p1465	М	19	31	210	Средняя
ПД	p1466	М	38	38	226	Легкая
ПД	p1470	Ж	41	32	200	Легкая
ПД	p1476	М	30	34	254	Средняя
ПД	p1477	Ж	30	35	220	Средняя
ПД	p1480	М	29	37	200	Средняя
ПД	p1481	Ж	30	49	212	Легкая

ПД	p1482	Ж	36	39	266	Средняя
ПД	p1486	Ж	46	42	260	Средняя
ПД	p1487	М	46	42	260	Легкая
ПД	p1491	М	56	17	232	Легкая
ПД	p1495	М	41	45	257	Легкая
ПД	p1499	Ж	35	52	263	Средняя
ПД	p1507	М	29	39	237	Легкая
ПД	p1515	Ж	64	32	235	Средняя
ПД	p1521	Ж	36	64	292	Легкая
ПД	p1524	Ж	35	38	235	Средняя
ПД	p1526	М	50	41	261	Легкая
ПД	p1527	Ж	51	44	264	Легкая
ПД	p1528	Ж	20	41	261	Средняя
ПД	p1531	М	23	24	247	Легкая
ПД	p1532	Ж	56	20	243	Средняя
ПД	p1535	Ж	38	52	281	Средняя
ПД	p1537	М	37	50	271	Легкая
ПД	p1538	Ж	50	34	251	Средняя
ПД	p1541	Ж	41	41	256	Средняя
ПД	p1542	М	40	49	262	Легкая
ПД	p1543	Ж	38	39	251	Бессимптомное
ПД	p1550	Ж	58	32	187	Легкая
ПД	p1551	М	24	35	246	Легкая
ПД	p1561	Ж	61	63	272	Легкая
ПД	p1562	М	30	68	277	Легкая
ПД	p1565	М	63	72	281	Легкая
ПД	p1569	Ж	39	35	240	Средняя
ПД	p1576	Ж	24	34	243	Легкая
ПД	p005	М	33	34	213	Легкая
ПД, ЗД	p1048	Ж	26	25	187	Бессимптомное
ПД, ЗД	p952	М	36	18	241	Легкая
ПД, ЗД	p006	М	24	21	180	Легкая
ПД, ЗД	p859	Ж	25	60	254	Легкая
ЗД	p846	Ж	24	N/A	N/A	-
ЗД	p1018	Ж	23	N/A	N/A	-
ЗД	p1032	N/A	N/A	N/A	N/A	-
ЗД	p1187	N/A	N/A	N/A	N/A	-
ЗД	p1305	М	26	N/A	N/A	-

ЗД	p1440	Ж	30	N/A	N/A	-
ЗД	p818	Ж	N/A	N/A	N/A	-
ЗД	p1203	Ж	N/A	N/A	N/A	-
ЗД	p1184	Ж	N/A	N/A	N/A	-
ЗД	p021	Ж	N/A	N/A	N/A	-
ЗД	p815	М	N/A	N/A	N/A	-
ЗД	p258	М	N/A	N/A	N/A	-
ЗД	p931	М	N/A	N/A	N/A	-
ЗД	p933	М	N/A	N/A	N/A	-
ЗД	p944	М	N/A	N/A	N/A	-

ПД - переболевший донор, ЗД - здоровый донор, Ж - женщина, М - мужчина, N/A - информация не доступна

2.1.2. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC)

30 мл венозной крови доноров собирали в пробирки, содержащие антикоагулянт ЭДТА (Sarstedt). Кровь подвергали центрифугированию в градиенте плотности Ficoll (Paneco) (400 x g, 30 мин). Выделенные PBMC промывали фосфатно-солевым буфером (ФБС), содержащим 2 mM ЭДТА, и использовали для дальнейших анализов или замораживали в эмбриональной телячьей сыворотке, содержащей 7% ДМСО.

2.1.3. In vitro антиген-специфичные экспансии из Т-клеток

Для постановки антиген-специфичных экспансий из Т-клеток *in vitro* мы использовали PBMC доноров, имеющих от 1 до 4 аллелей HLA-A*02:01, HLA-A*03:01, HLA-B*40:01 и HLA-B* 27:05. Экспансии ставили по протоколу, который был описан ранее (Danilova et al., 2018). 9×10^6 клеток каждого донора брали в анализ, разделяли между тремя лунками и инкубировали в течение 10-12 дней в культуральной среде RPMI 1640, дополненной 10% нормальной человеческой сывороткой A/B, 1 mM пирувата натрия, 25 нг/мл IL-7, 40 нг/мл IL-15 и 50 нг/мл IL-2 (Miltenyi Biotech). Конечный объем в лунке составлял 2 мл. Половину среды заменяли на свежую на 3, 5 и 7-й дни инкубации. Смесь

пептидов из SARS-CoV-2, растворенных в DMSO или смеси MES-буфера/изопропанола, добавляли на 0-й день. Конечная концентрация каждого пептида в среде составляла 10 нг/мл. Смесь пептидов составляли для каждого донора индивидуально, исходя из состава его аллелей HLA.

2.1.4. Окрашивание клеток при помощи МНС-тетрамеров

Антиген-специфичные клетки детектировали путем окрашивания клеточных экспансий антителами CD3-AF700 (Sony), CD8-FITC (Sony), 7AAD (BD) и комбинациями двух различных пептид-МНС-тетрамерных комплексов, конъюгированных со стрептавидин-аллофикоцианином и стрептавидин-R-фикоэритрином (Thermo Fisher Scientific), как описано ранее (Vdovin et al., 2016). Мы считали окрашивание положительным, если процент CD3+/CD8+/МНС-тетрамер+ клеток превышал 0,03–0,4%, в зависимости от конкретного МНС-тетрамера. Для сортировки клеток использовали клеточный сортер Aria III (BD Biosciences), данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (версия 10.6.1).

2.2. Молекулярно-биохимические методы

2.2.1. Генотипирование HLA

Все переболевшие доноры были генотипированы на аллели HLA с помощью набора One Lambda ALLType (Thermo Fisher Scientific), который использует мультиплексную ПЦР для амплификации полных последовательностей генов HLA-A/B/C и генов HLA-DRB1/3/4/5/DQB1 от экзона 2 до 3' UTR. Подготовленные библиотеки были просеквенированы на секвенаторе Illumina MiSeq. Результаты были проанализированы с использованием визуального программного обеспечения One Lambda HLA TypeStream (TSV) версии 2.0.0.27232 и базы данных IPD-IMGT/HLA 3.39.0.0.

Здоровые доноры были генотипированы на аллели HLA методом секвенирования по Сэнгеру для локусов HLA-A, B, C, DRB1 и DQB1 с

использованием реагентов Protrans S4 и S3. Продукты ПЦР были подготовлены для секвенирования с помощью реагента BigDye Terminator v1.1 (Thermo Fisher Scientific). Капиллярный электрофорез проводили на генетическом анализаторе Nanophore 05 и анализировали встроенным программным обеспечением.

HLA-типирование доноров представлено в **Таблице 2**.

Таблица 2. HLA-типирование доноров, чьи образцы были использованы для постановки Т-клеточных экспансий.

№ донора	HLA-A1*	HLA-A2*	HLA-B1*	HLA-B2*	HLA-C1*	HLA-C2*
p1426	02:01:01:01	24:02:01:01	38:01:01:01	40:01:02	03:04:01:01	12:03:01:01
p1445	02:01:01:01	03:01:01:01	44:02:01:01	44:27:01:01	05:01:01:02	07:04:01
p1447	31:01:02:01	31:01:02:01	40:01:02	55:02:01:03	01:02:01:01	03:04:01:01
p1448	02:01:01:01	26:01:01:01	27:05:02:01	39:01:01:05	07:02:01:03	12:03:01:01
p1452	03:01:01:01	29:01:01:01	35:01:01:05	44:02:01:01	04:01:01	16:04:01:01
p1463	01:01:01:01	32:01:01:01	27:05:02:05	37:01:01:01	01:02:01:01	06:02:01:01
p1466	11:01:01:01	32:01:01:01	08:01:01:02	52:01:01:02	07:02:01:01	12:02:02:01
p1470	03:01:01:01	23:01:01:01	35:01:01:05	44:03:01:19	04:01:01	04:09N
p1480	02:01:01:01	03:01:01:03	40:01:02	58:01:01:03	03:02:02:05	03:04:01:01
p1482	01:01:01:01	68:12:01	15:01:01:01	18:03:01:01	06:02:01:01	07:01:01
p1486	01:01:01:01	03:01:01:01	35:01:01:05	52:01:01:02	04:01:01	12:02:02:01
p1491	03:01:01:01	24:02:01:01	35:01:01:05	35:03:01	04:01:01	04:01:01
p1495	02:01:01G	23:01:01G	27:05:02G	44:03:01G	02:02:02G	04:01:01G
p1499	02:01:01G	03:01:01G	07:17	51:01:01G	02:02:02G	07:02:01G
p1507	02:01:01G	03:01:01G	13:02:01G	15:01:01G	03:03:01G	06:02:01G
p1524	03:01:01:01	26:01:01:01	08:01:01:01	51:01:01:01	07:01:01	14:02:01
p1527	25:01:01:01	25:01:01:01	13:02:01:01	40:01:02	03:04:01:01	06:02:01:01
p1528	02:01:01:01	25:01:01:01	18:01:01	40:01:02	01:02:01:01	03:04:01:01

p1531	01:01:01:01	02:01:01:01	15:01:01:01	40:01:02	03:03:01:01	03:04:01:01
p1532	02:01:01:01	03:01:01:01	07:02:01:01	40:01:02	03:04:01:01	07:02:01:03
p1535	02:01:01:01	02:01:01:01	27:05:02:05	27:05:02:10	01:02:01:01	01:02:01:01
p1537	01:01:01:01	24:02:01:01	08:01:01:01	37:01:01:01	06:02:01:01	07:01:01
p1541	03:01:01:01	68:01:01:02	35:03:01	51:01:01:10	04:01:01	05:01:01:02
p1542	02:01:01:01	02:01:01:01	44:02:01:01	49:01:01:01	07:01:01	16:02:01:01
p1550	11:01:01:01	25:01:01:01	15:01:01:01	18:01:01	04:01:01:05	12:03:01:01
p1551	02:01:01:01	68:01:01:02	07:02:01:01	44:02:01:01	05:01:01:02	07:02:01:03
p1561	03:01:01:01	03:01:01:01	07:02:01:01	07:02:01:01	07:02:01:03	07:02:01:03
p1562	01:01:01:01	03:01:01:01	07:02:01:01	13:02:01:01	06:02:01:01	07:02:01:03
p1569	02:01:01:01	11:01:01:01	35:08:01:01	57:01:01:01	04:01:01:28	06:02:01:01
p005	1:01	2:01	8:01:01	44	N/A	N/A
p1048	01:01:01:01	03:01:01:01	41:02	52:01:01:02	07:01:01	17:01
p952	2:01	03:01	49	51	4	7
p859	2:01	2:01	7:02	7:02	7:02	7:02
p1018	02:01:01:01	1:01	35:01:00	27:05:00	1:02	4:01
p818	2:01	24:02:00	40:01:00	49:01:00	3:04	7:01
p1203	02:01:01:01	03:01:01:01	40:01:01	40:02:01	2:02:02	3:04:01
p1184	02:01:01:01	03:01:01:01	13:02:01	57:01:01	6:02	6:02

2.2.2. Пептиды SARS-CoV-2

20 эпитопов из различных белков SARS-CoV-2 были включены в анализ, на том основании, что они (1) имели высокую аффинность (ранг < 2) согласно базе данных NetMHCpan 4.1 (Reynisson et al., 2020) и (2) были иммуногенными согласно опубликованным данным. Подробная информация о выбранных пептидах приведена в **Таблице 3**.

Пептиды (чистота не менее 95%) были синтезированы либо Peptide 2.0, либо Институтом Биоорганической Химии им. Шенякина-Овчинникова Российской Академии Наук. Пептиды, содержащие Cys и/или Met, разводили в смеси ФБС/изопропанола (1:1 об/об) в концентрациях до 10-25 мМ. Другие пептиды разводили в ДМСО (Sigma-Aldrich) до 30-40 мМ.

Таблица 3. Пептиды SARS-CoV-2, используемые в данном исследовании.

#	Аминокислотная последовательность	Название	Длина	Белок	Позиция	Аллель рестрикции	Связывание	Ссылка
1	ALSKGVHFV	ALS	9	ORF3a	72-80	A 02:01	0.1068	Kared et al., 2021; Nelde et al., 2021; Saini et al., 2021
2	ALWEIQQVV	ALW	9	ORF1ab	4099-4107	A 02:01	0.0523	Ferretti et al., 2020
3	AQFAPSASAF	AQF	10	N	305-314	B 40:01	1.247	Schulien et al., 2021
						B 44:03	0.8978	
4	ATSRTLSYYK	ATS	10	M	171-190	A 03:01	0.0566	Ferretti et al., 2020
5	FTSDYYQLY	FTS	9	ORF3a	207-215	C 07:02	0.1246	Ferretti et al., 2020; Kared et al., 2021; Saini et al., 2021
6	KCYGVSPTK	KCY	9	S	378-386	A 03:01	0.9738	Ferretti et al., 2020; Saini et al., 2021
7	KLWAQCVQL	KLW	9	ORF1ab	27-35	A 02:01	0.1083	Ferretti et al., 2020
8	KTFPPTEPK	KTF	9	N	361-369	A 03:01	0.0548	Ferretti et al., 2020; Kared et al., 2021; Saini et al., 2021
						C 07:02	8.268	
9	LLLDRLNQL	LLLD	9	N	222-230	A 02:01	0.1398	Kared et al., 2021
						C 07:02	1.0954	
10	LLLLDRLNQL	LLL	10	N	221-230	A 02:01	1.1237	Nelde et al., 2021
11	LLYDANYFL	LLY	9	ORF3a	139-147	A 02:01	0.0071	Ferretti et al., 2020; Kared et al., 2021

12	MEVTPSGTWL	MEV	10	N	322-331	B 40:01	0.1078	Nelde et al., 2021
						B 44:03	0.1862	
13	NRFLYIIKL	NRF	9	M	43-51	B 27:05	0.368	Nelde et al., 2021; Saini et al., 2021
14	QLRARSVSPK	QLR	10	ORF7a	76-85	A 03:01	0.1639	Nelde et al., 2021
15	RLQSLQTYV	RLQ	9	S	1000-1008	A 02:01	0.1610	Shomuradova et al., 2020
16	SELVIGAVIL	SEL	10	M	136-145	B 40:01	0.0713	Nelde et al., 2021
						B 44:03	0.3593	
17	VVFLHVTYV	VVH	9	S	1060-1068	C 07:02	1.665	Kared et al., 2021; Saini et al., 2021
18	VYFLQSINF	VYQ	9	ORF3a	112-120	C 07:02	0.1981	Kared et al., 2021; Nelde et al., 2021
19	VYIGDPAQL	VYI	9	ORF1ab	5840-5848	C 07:02	0.1400	Kared et al., 2021; Nelde et al., 2021; Saini et al., 2021
20	YLQPRTFLL	YLQ	9	S	269-277	A 02:01	0.0227	Ferretti et al., 2020; Shomuradova et al., 2020; Kared et al., 2021
						C 07:02	0.0523	

Связывание пептидов с HLA было предсказано алгоритмом NetMHCpan 4.1. М - Мембранный, N - Нуклеокапсидный, S - Шиповидный белки. Комбинация пептида и аллеля рестрикции, использованные для *in vitro* антиген-специфичных экспансий, выделены жирным шрифтом

2.2.3. Производство биотинилированных МНС I-пептидных комплексов

Все использованные химикаты аналитического класса были приобретены в фирме Sigma-Aldrich, за исключением ЭДТА, азида натрия (Amresco), хлорида натрия (Малиновое озеро) и коктейля ингибиторов протеаз (Thermo). Используемая рекомбинантная биотин-лигаза была собственного производства. Растворы готовили на деионизированной воде (система очистки воды Simplicity, Merck-Millipore) и фильтровали с использованием шприцевых фильтров 0,45 мкм (Sarstedt).

Растворимый HLA, загруженный различными пептидами, был получен путем сворачивания *in vitro* телец включения *E. coli*, как было описано ранее (Garboczi et al., 1992) с модификациями (Shomuradova et al., 2020). Вкратце, тяжелые (HLA с меткой биотинилирования) и легкие (бета-2 микроглобулин) цепи человека экспрессировали в штамме *E. coli* BL21(DE3) pLysS в качестве телец включения и использовали для фолдинга (приобретения белками третичной структуры) *in vitro*. Пептиды, легкие и тяжелые цепи смешивали в буфере (100 мМ Трис-HCl, 400 мМ аргинина, 5 мМ восстановленного глутатиона, 0,5 мМ окисленного глутатиона, 2 мМ ЭДТА, ингибиторы протеазы, 1 мМ PMSF, pH = 8,0) в конечном молярном соотношении 30:4:3. Фолдинг проводили при 8°C в течение 5 дней. Правильно свернутые комплексы очищали методом гель-фильтрации с использованием сорбента Superdex 75 pg 16/600 (Cytiva) и Трис-буферного физиологического раствора (20 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, pH 8,0) в качестве подвижной фазы. Комплексы биотинилировали биотин-лигазой собственного производства (20 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, 40 мМ АТФ, 0,4 мМ биотина, 6,5 мМ MgCl₂, 25 мкг/мл биотин-лигазы, коктейль ингибиторов протеаз) при 30°C в течение 1 часа или при 8°C в течение ночи и очищали методом гель-фильтрации с использованием сорбента Superdex 75 pg 10/300. Биотинилированные мономеры концентрировали до конечной концентрации 0,4–1,0 мг/мл и хранили в 20% глицерине, 0,1% азиде натрия, 0,1 мМ ЭДТА и

коктейле ингибиторов протеаз. Концентрации определяли методом детекции удельного поглощения, $A_{280} = 2,36$ и $1,68$ для HLA и бета-2 микроглобулина соответственно (расчетные показатели на основе аминокислотной последовательности по данным SnapGene Viewer). Плазмиды, кодирующие HLA и бета-2 микроглобулин, были любезно предоставлены Тоном Шумахером (The Netherlands Cancer Institute, Амстердам, Нидерланды).

2.2.4. Иммуноферментный анализ (ИФА)

Для выявления анти-RBD IgG использовали набор ИФА (Национальный Медицинский Исследовательский Центр Гематологии) в соответствии с инструкциями производителя. Образцы сыворотки крови, полученные после осаждения форменных элементов крови методом центрифугирования в пробирках с коагулянтом, использовали для дальнейших анализов или замораживали. При проведении анализа образцы инкубировали в лунках планшета, на поверхности которых иммобилизован рекомбинантный RBD антиген SARS-CoV-2. Антитела из образца связывались с антигеном на поверхности лунки, после чего окрашивались с помощью конъюгата мышиных моноклональных антител к IgG человека с пероксидазой хрена. Во время инкубации с субстратным раствором тетраметилбензидина происходило окрашивание раствора в лунках. Оптическую плотность (OD) измеряли при 450 нм с измерением фонового поглощения при 650 нм на приборе MultiScan FC (Thermo Fisher Scientific). Интенсивность окраски была прямопропорциональна содержанию IgG-антител в исследуемом образце. Среднее значение двух значений OD для каждого образца делили на среднее значение двух значений OD положительного контроля, входящего в состав набора, и использовали в качестве индекса позитивности.

$$\text{Индекс позитивности} = \frac{\text{Среднее Значение OD}_{\text{образца}}}{\text{Среднее Значение OD}_{\text{положительного контроля}}}$$

Пороговое значение определяли в соответствии с инструкциями производителей. Все образцы с индексом положительности >1 считались положительными.

2.2.5. ELISpot на интерферон- γ (IFN γ)

Продукцию IFN γ антиген-специфичными Т-клетками измеряли с помощью набора ImmunoSpot human IFN γ single-color ELISPOT kit (CTL) на 96-луночном планшете с нитроцеллюлозной мембраной, предварительно покрытой антителом для захвата IFN γ . РВМС после разморозки наносили на поверхность лунки с плотностью 5×10^5 /лунка и отдельно стимулировали пептидными пулами, полученными из S, М или N белков SARS-CoV-2 (130-126-701, 130-126-703, 130-126-699, Miltenyi Biotec), в дубликатах при конечной концентрации 1 мкМ в тестовой бессывороточной среде (CTL), содержащей 1 мМ GlutaMax (GIBCO). Конечный объем в лунке составлял 200 мкл. Планшеты инкубировали в течение 16 ч при 37°C в 5% CO₂. Анализ проводили в соответствии с инструкциями производителя. Пятна подсчитывали с помощью анализатора CTL ImmunoSpot с использованием программного обеспечения ImmunoSpot. Из каждого значения вычитали фон (отрицательный контроль) и использовали среднее значение двух лунок с одинаковым пулом пептидов. Пороговое значение позитивности было определено по анализу 11 образцов здоровых доноров для каждого пула пептидов как **Среднее Значение + 1,69* Стандартное Отклонение**.

2.2.6. Выделение тотальной РНК

Экстракция тотальной РНК из различных фракций клеток осуществлялась с использованием коммерческого реагента Trizol (Invitrogen) и пробирок для выделения РНК Phasemaker (Thermo Fisher Scientific) по протоколу производителя.

Сортировку CD3⁺/CD8⁺/МНС-тетрамер⁺ фракций осуществляли непосредственно в лизирующий реагент Trizol. Сортировку CD3⁺/CD8⁺/МНС-тетрамер- фракций, а также отбор тотальных фракций клеток осуществляли в

среду RPMI1640, содержащую 2мМ L-глутамин и 1% пенициллин-стрептомицин. Клетки затем осаждали при помощи центрифугирования (350g, 5 мин) и ресуспендировали в лизирующем реагенте Trizol. Клеточный лизат переносили в пробирки для выделения РНК Phasemaker, инкубировали 5 минут при комнатной температуре, затем добавляли 100 мкл хлороформа (Sigma-Aldrich) и интенсивно встряхивали раствор 15-20 с, инкубировали при комнатной температуре 5 мин, после чего центрифугировали (16000g, 5 мин, 4°C). В результате центрифугирования раствор разделялся на фракции: верхняя водная (содержит РНК) оставалась над разделительным гелем, а интерфаза (содержит ДНК и часть белков) и нижняя органическая (большинство белков и короткие фрагменты ДНК) оказывались под разделительным гелем. Верхнюю водную фракцию отбирали в чистую пробирку и добавляли 250 мкл изопропанола (Merck) и 1 мкл соосадителя Satellite Red (Евроген). Смесь перемешивали, инкубировали при комнатной температуре 10 мин и центрифугировали (16000g, 10 мин, 4°C). Супернатант отбирали, а к красному осадку на дне пробирки добавляли 1 мл 80% этанола (Merck) и центрифугировали (16000g, 10 мин, 4°C). Супернатант отбирали и к красному осадку на дне пробирки добавляли 600 мкл 80% этанола и центрифугировали (16000g, 10 мин, 4°C). После этого супернатант отбирали и сушили осадок при температуре 37 °С до полного испарения этанола, после чего растворяли осадок в 4-15 мкл воды без нуклеаз в течение 5 минут при температуре 45 °С. Концентрацию РНК измеряли с помощью флуориметра Qubit4 (Thermo Fisher Scientific). Оценка качества выделенной РНК осуществлялась при помощи системы капиллярного электрофореза Agilent (Agilent). Образцы РНК считали качественными при значении показателя целостности RIN (RNA integrity number) больше 7. Выделенные препараты РНК не хранили.

2.2.7. Синтез комплементарной ДНК (кДНК)

Обратная транскрипция осуществлялась с использованием коммерческого реагента SMARTScribe Reverse Transcriptase (TaKaRa) по протоколу производителя с изменениями, описанными ранее (Zvyagin et al., 2017).

Вкратце, реакция синтеза кДНК для β -цепей ТКР была проведена с использованием праймера для С-концевой области и SMART-Mk, обеспечивающего эффект 5'-переключения матрицы синтеза и содержащего штрих-код образца для контроля загрязнения. На каждые 3 мкл образца, содержащие не более 500 нг РНК, добавляли 2 мкл бетаинового буфера, 2мМ DTT, 1 мкл смеси дезоксинуклеотидов dNTP (10 мМ), смесь праймеров, уникальный штрих-код, а также 100U/мкл обратной транскриптазы. Раствор перемешивали и инкубировали 1,5 ч при 42°C, реакцию терминировали нагреванием в течение 5 мин при 70°C. Далее в реакцию добавляли 1 мкл урацил-ДНК гликозилазы, доводили объем реакции водой до 30 мкл и инкубировали 1 ч при 37°C, реакцию терминировали нагреванием в течение 5 мин при 70°C. Очистка кДНК от реакционной смеси проводилась при помощи Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Синтезированную кДНК хранили при -80°C.

Библиотеки ТКР тотальных образцов РВМС были приготовлены с использованием набора TCR human multiplex (MiLaboratories) в соответствии с инструкциями производителя.

2.2.8. Секвенирование

Количество ДНК-продукта увеличивали при помощи полимеразных цепных реакций, в которых также происходило добавление к последовательностям уникальных для каждого образца молекулярных идентификаторов. Очистку ПЦР-продуктов на всех этапах проводили при помощи Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter). Оценку качества ДНК осуществляли при помощи системы капиллярного электрофореза Agilent (Agilent). Измерение концентраций ДНК проводили при помощи флуориметра

Qubit4 (Thermo Fisher Scientific). Секвенирование выполняли с помощью платформы Illumina MiSeq или NextSeq.

2.3. Обработка данных

2.3.1. Анализ репертуаров Т-клеточных рецепторов

Данные репертуаров ТКР анализировали с использованием программного обеспечения MIXCR, MIGEC и VDJtools с настройками по умолчанию.

Эпитоп-специфичные Т-клеточные рецепторы были определены как клонотипы, которые значительно чаще обнаруживались в МНС-тетрамер+ фракции по сравнению с МНС-тетрамер- фракцией (частота ≥ 10 раз выше, значение $p < 10^{-12}$, точный критерий Фишера). Клоны со специфичностью к нескольким эпитопам были удалены из анализа. Последовательности ТКР, специфичные для эпитопов, сопоставляли с наборами данных из баз данных Multiplex Identification of T cell Receptor Antigen Specificity (MIRA)(Snyder et al., 2020) и VDJdb (<http://vdjdb.cdr3.net>) (Shugay et al., 2018; Vagayev et al., 2020). с использованием инструмента VDJmatch с максимальным расстоянием Левенштейна, равным 1. Графики были построены с использованием пакета “igraph” R версии 1.2.6. Матрицы весов были созданы с использованием пакета “ggseqlogo” версии 0.1.

2.3.2. Количественная оценка и статистический анализ

Все сравнения данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8 и python3. Для непараметрического сравнения двух независимых выборок и определения степени достоверности использовали критерий Манна-Уитни, для непараметрического сравнения двух выборок с парными значениями и определения степени достоверности использовали парный тест Уилкоксона. Значимым различием считали коэффициент достоверности $p \leq 0,05$. Для расчета коэффициента корреляции использовали корреляцию Спирмена.

Аффинность пептидов к аллелям HLA была предсказана с помощью алгоритма NetMHCpan 4.1 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetMHCpan-4.1>).

Глава 3. Результаты

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

При изучении уровня антител у переболевших доноров было показано, что гуморальный ответ присутствовал у большинства доноров: в ВТ1 88% доноров имели уровень антител выше порогового значения, а медиана индекса позитивности (метод расчета индекса позитивности описан в разделе 2.2.4. Иммуноферментный анализ (ИФА) Материалов и методов) составила 2.51 (**Рис.2А**). Т-клеточный ответ был оценен по количеству IFN γ -секретирующих клеток, соответствующего количеству точек/ 1×10^6 клеток после стимуляции в ELISpot анализе. Для определения порогового значения, выше которого результат считался положительным, были использованы образцы от здоровых доноров (см. раздел 2.2.5. ELISpot на интерферон- γ в Материалах и методах). Пороговое значение для ответа на S белок составило 6.4 точек/ 1×10^6 клеток, на M белок 13.2 точек/ 1×10^6 клеток и на N белок 16.2 точек/ 1×10^6 клеток. При анализе когорты переболевших было показано, что у 80% доноров выявлялись Т-клетки, секретирующие IFN γ в ответ на стимуляцию пептидными пулами, полученными из S и N белков, и 90% - в ответ на стимуляцию пептидным пулом из M белка SARS-CoV-2 (**Рис.2Б**). Медиана количества секретирующих IFN γ клеток на 1×10^6 клеток составила 27 для S-белка, 58.5 для M белка и 54.5 для N-белка.

Через восемь месяцев после заболевания (ВТ2) 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 (**Рис.2А**). 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 M белок и у 26/50 (52%) доноров на N белок, что было значительно ниже по сравнению с 40-45 (80-90%) донорами в ВТ1. Медиана количества

секретирующих $IFN\gamma$ 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 $IFN\gamma$ клеток на 1×10^6 клеток составила 10.5 для S-белка, 17.5 для M белка и 18.5 для N-белка. Наименее иммуногенным в точке BT2 был N белок: ответ на него детектировался у 26/50 (52%) пациентов, однако наименее интенсивный ответ вызывал S белок: медианное количество клеток, секретирующих $IFN\gamma$, было в 1.8-1.7 раз ниже, чем при стимуляции N и M белками (Рис.2Б).

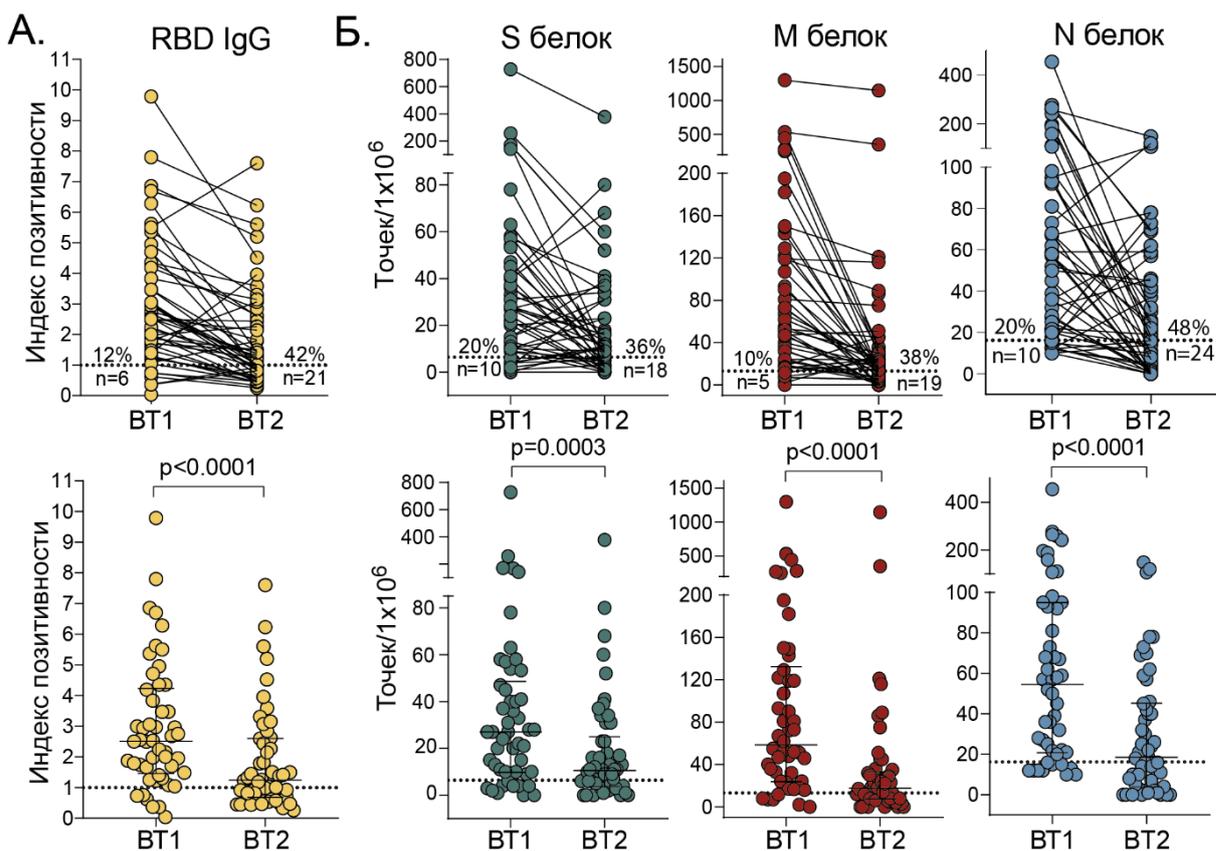


Рисунок 2. Гуморальный и клеточный иммунный ответ у доноров, переболевших SARS-CoV-2 (N = 50).

А. Индекс позитивности анти-RBD IgG антител в двух временных точках (BT1, BT2). **Б.** Т-клеточный ответ на пулы пептидов из Шиповидного (S, зеленый), Мембранного (M, красный) и Нуклеокапсидного (N, синий) белков. Пунктирная линия отмечает пороговое значение позитивности. Верхний 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. Нижний график показывает медиану с межквартильным диапазоном (парный тест Уилкоксона).

Как в первой, так и во второй временных точках Т-клеточный иммунный ответ был детектированы у большего числа людей, по сравнению с гуморальным ответом. В ВТ1 только у 3/50 (6%) человек не были выявлены специфичные Т-клетки ни к одному из трех белков, в то время как уровень антител ниже порогового значения определялся у 6/50 (12%) человек. Стоит отметить, что среди этих 6 человек, у 5 был обнаружен Т-клеточный ответ хотя бы на два различных белка. Среди 3 доноров без специфичных Т-клеток гуморальный ответ был обнаружен у 2 (Рис.3А).

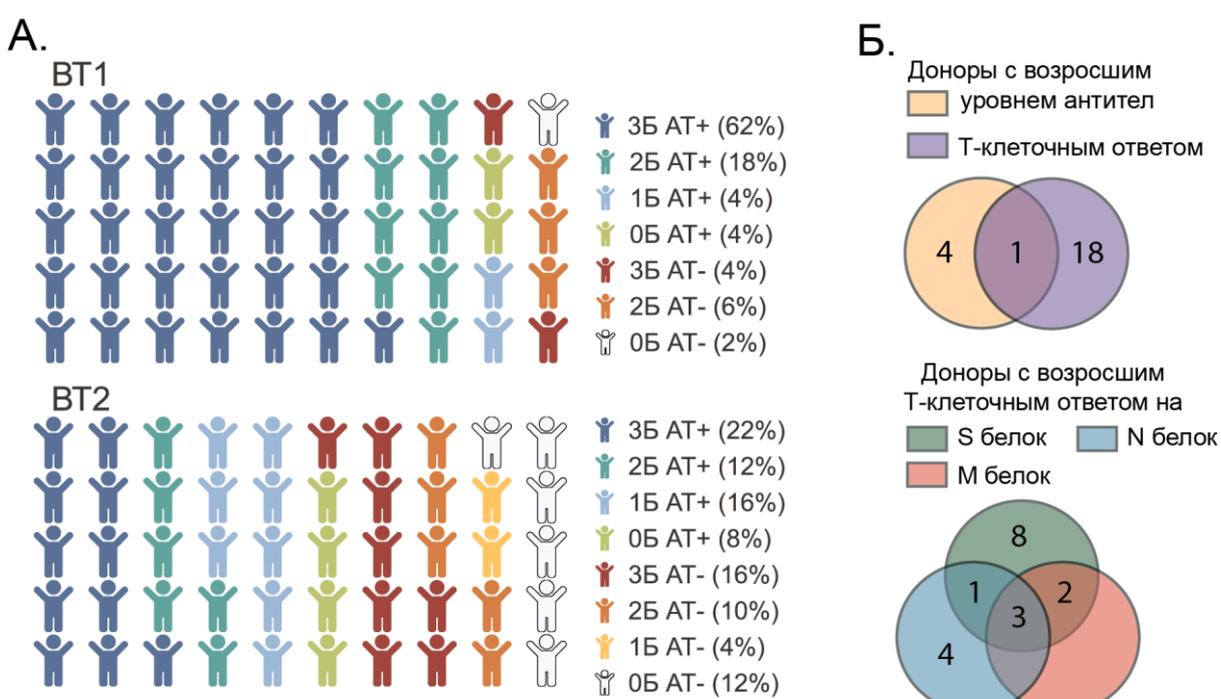


Рисунок 3. Распределение иммунного ответа у доноров, переболевших SARS-CoV-2 (N = 50).

А. Распределение иммунного ответа у доноров в первой и второй временных точках. 0Б-3Б - наличие Т-клеток, продуцирующих $IFN\gamma$ в ответ на стимуляцию 1-3 белками SARS-CoV-2; АТ - наличие (+) или отсутствие (-) анти-RBD IgG антител. **Б.** Диаграммы Венна, отображающие пересечение доноров с иммунным ответом, возросшим в точке ВТ2: сверху - с возросшим уровнем антител (желтый) и количеством $IFN\gamma$ -продуцирующих клеток (фиолетовый); снизу - с возросшим количеством $IFN\gamma$ -продуцирующих клеток в ответ на стимуляцию S (зеленый), М (красный) и N (синий) белками.

В ВТ2 Т-клетки, продуцирующие $IFN\gamma$ при стимуляции хотя бы одним белком, имели 40/50 (80%) доноров, в то время как антитела детектировались у

29/50 (58%) человек. Стоит отметить, что из 21 серонегативного донора 9 (42,9%) сохранили Т-клеточный иммунный ответ (**Рис.3А**). Медиана количества IFN γ - продуцирующих клеток у этих доноров была 23, 29 и 40 для S, M и N белков, соответственно, что выше, чем значения медианы для всех доноров в ВТ2. Таким образом, Т-клетки, отвечающие на стимуляцию антигенами вируса, присутствовали в организме дольше, чем антитела.

У некоторых доноров наблюдалось повышение уровня антител и/или количества IFN γ -продуцирующих клеток. Так, у 5/50 (10%) доноров индекс позитивности антител вырос в 1,1-2,8 раз (медиана = 1,65), а у 19/50 (38%) было детектировано большее число Т-клеток, секретирующих IFN γ после стимуляции: в 1,1-10 раз (медиана = 2,4) на S белок, 1,1-14 раз (медиана = 2,25) на M белок и 1,1 - 4,9 раз (медиана = 1,7) на N белок (**Рис.2**). При этом у 6 из этих 19 человек наблюдалось увеличение числа Т-клеток, специфичных к более, чем одному белку (**Рис.3Б**). Можно предположить, что это произошло из-за того, что доноры могли контактировать с вирусом между взятием образцов крови, и, соответственно, дополнительно стимулировали Т-клеточный иммунный ответ.

Анализ корреляции Спирмена показал, что количество клеток, секретирующих IFN γ в ответ на стимуляцию M, N и S белками SARS-CoV-2, коррелировало между собой как в каждой из временных точек, так и между двумя временными точками. Уровень антител коррелировал между ВТ1 и ВТ2, но не с Т-клеточным ответом (**Рис.4**).

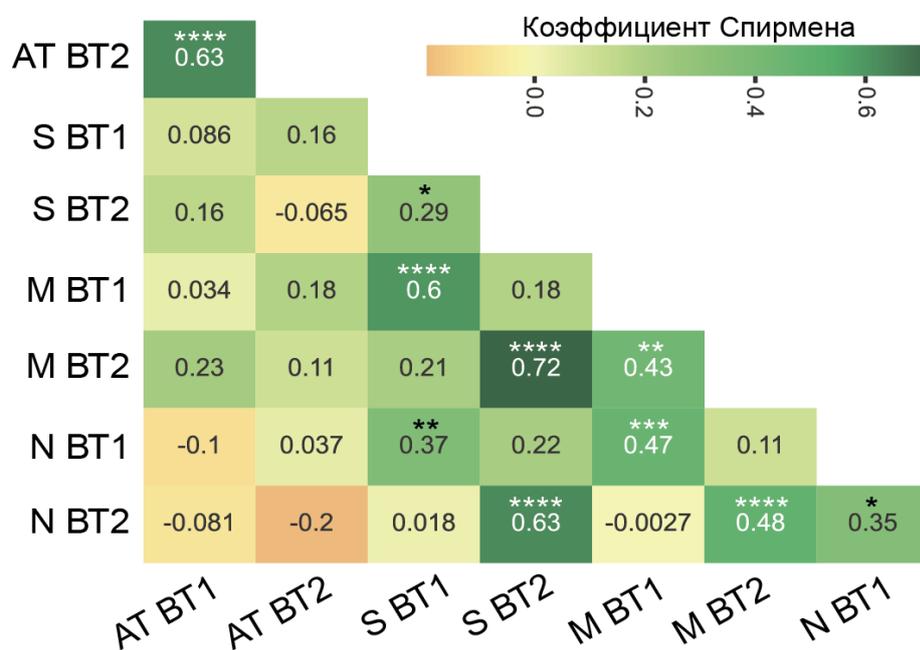


Рисунок 4. Корреляция гуморального и клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2.

Корреляция Спирмена между индексом позитивности антител (АТ) и количеством клеток, продуцирующих IFN γ в ответ на стимуляцию S, М и N белками SARS-CoV-2.

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$

При этом мы не обнаружили корреляции между возрастом доноров и индексом позитивности антител или количеством клеток, продуцирующих IFN γ в ответ на стимуляцию вирусными белками (Рис.5).

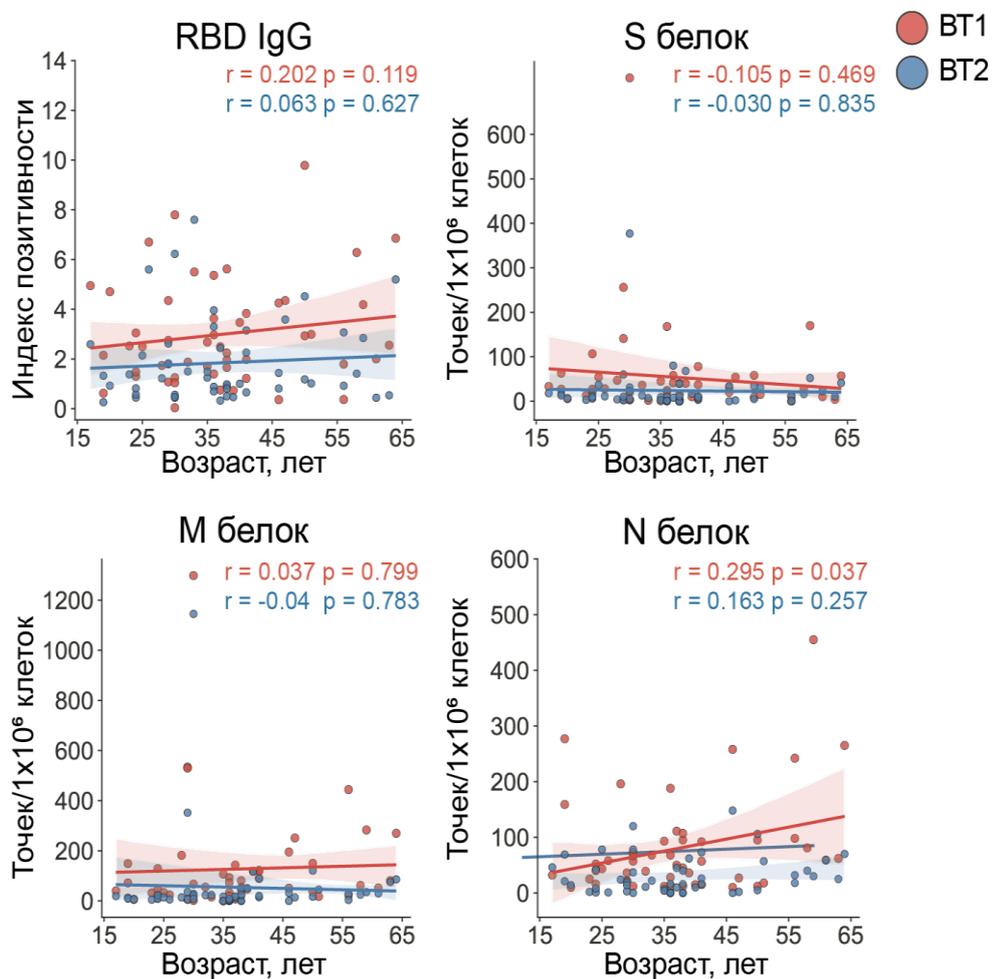


Рисунок 5. Корреляция между иммунным ответом на SARS-CoV-2 и возрастом доноров.

Корреляция Спирмена между возрастом доноров и гуморальным (RBD IgG) или клеточным ответами на S, M и N белки SARS-CoV-2.

r - коэффициент корреляции, p - уровень значимости (тест Манна-Уитни).

Как уровень антител, так и количество $IFN\gamma$ -продуцирующих Т-клеток также не зависели от пола доноров (Рис.6).

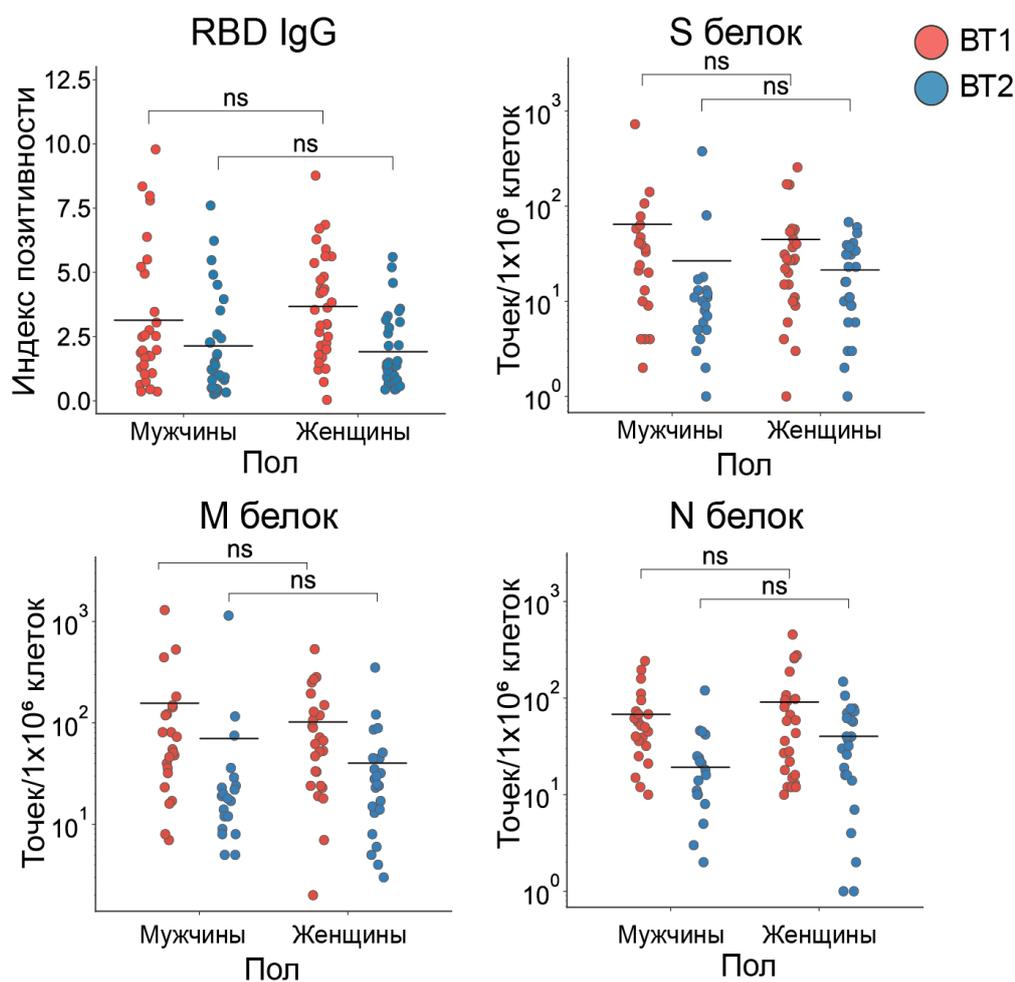


Рисунок 6. Влияние пола доноров на иммунный ответ на SARS-CoV-2.

Влияние пола доноров на индекс позитивности IgG антител к белку RBD или на количество клеток, секретирующих $IFN\gamma$ в ответ на стимуляцию S, M и N белками SARS-CoV-2 в первой (BT1) и второй (BT2) временных точках. Тест Манна-Уитни.

Кроме того, мы не обнаружили зависимости уровня ответа от того, в какой момент после начала заболевания были взяты образцы крови внутри каждой временной точки (между 17 и 72 днем для BT1 или между 180 и 292 днем для BT2) (Рис.7).

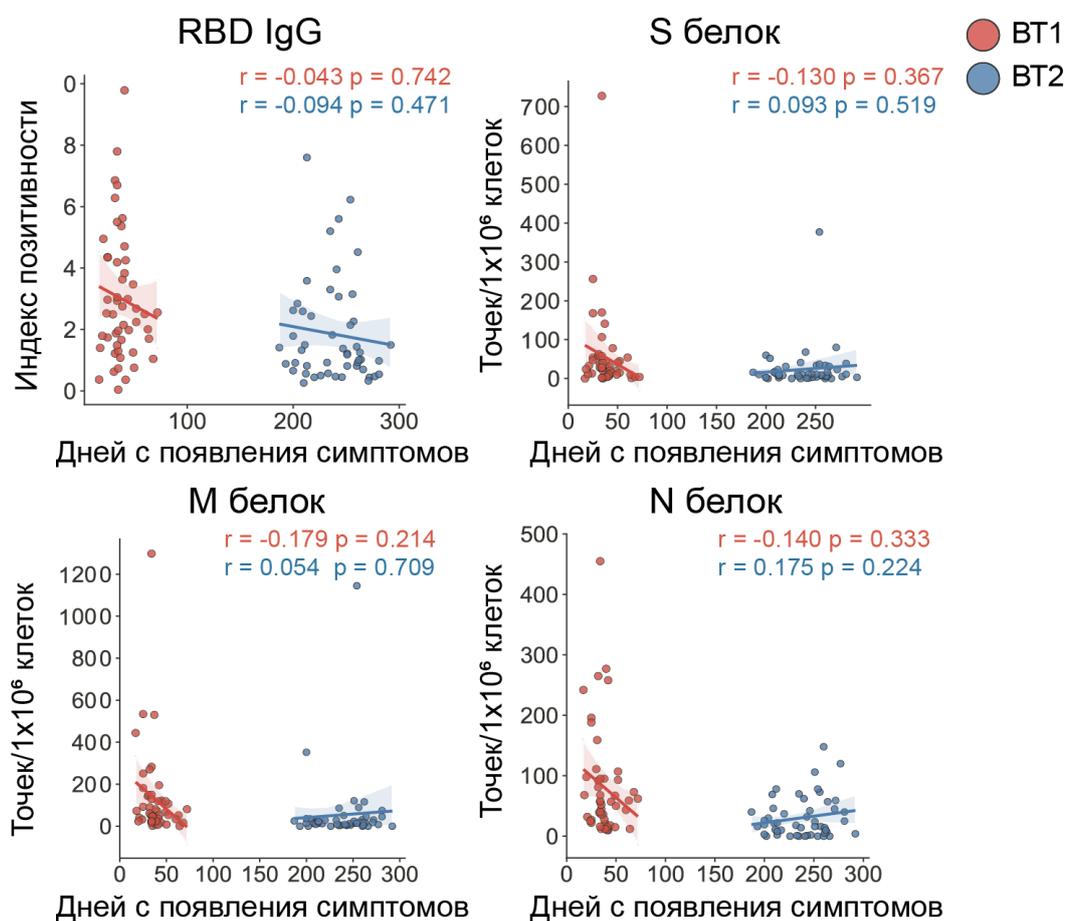


Рисунок 7. Корреляция между иммунным ответом на SARS-CoV-2 и временем взятия образцов крови.

Корреляция Спирмена между сроком взятия образцов крови после перенесенного заболевания и гуморальным (RBD IgG) или клеточным ответами на S, M и N белки SARS-CoV-2 в первой (BT1) и второй (BT2) временных точках. r - коэффициент корреляции, p - уровень значимости (тест Манна-Уитни).

3.2. Эпитоп-специфичный ответ CD8+ Т-клеток снижается, но остается детектируемым в течение 8 месяцев после инфекции

На основе литературных данных нами был сформирован список из 20 иммуногенных эпитопов. Ранее в литературе (Ferretti et al., 2020; Shomuradova et al., 2020; Kared et al., 2021; Nelde et al., 2021; Saini et al., 2021) эти эпитопы были охарактеризованы как иммуногенные. Подробная информация о пептидах представлена в разделе «Пептиды SARS-CoV-2» и **Таблице 3** в Материалах и методах. Для 15 из этих эпитопов мы успешно смогли получить комплекс

рекомбинантный МНС-пептид, пригодный для дальнейшего анализа методом проточной цитометрией.

На основе HLA-типирования мы отобрали 26 доноров для дальнейшего исследования (Таблица 2 в разделе «Генотипирование HLA» Материалов и методов). Лимфоциты периферической крови этих доноров были использованы для постановки *in vitro* антиген-специфичных экспансий (Danilova et al., 2018; Shomuradova et al., 2020; Titov et al., 2022). Эпитоп-специфичные клетки детектировали при помощи МНС-тетрамеров (Рис.8).

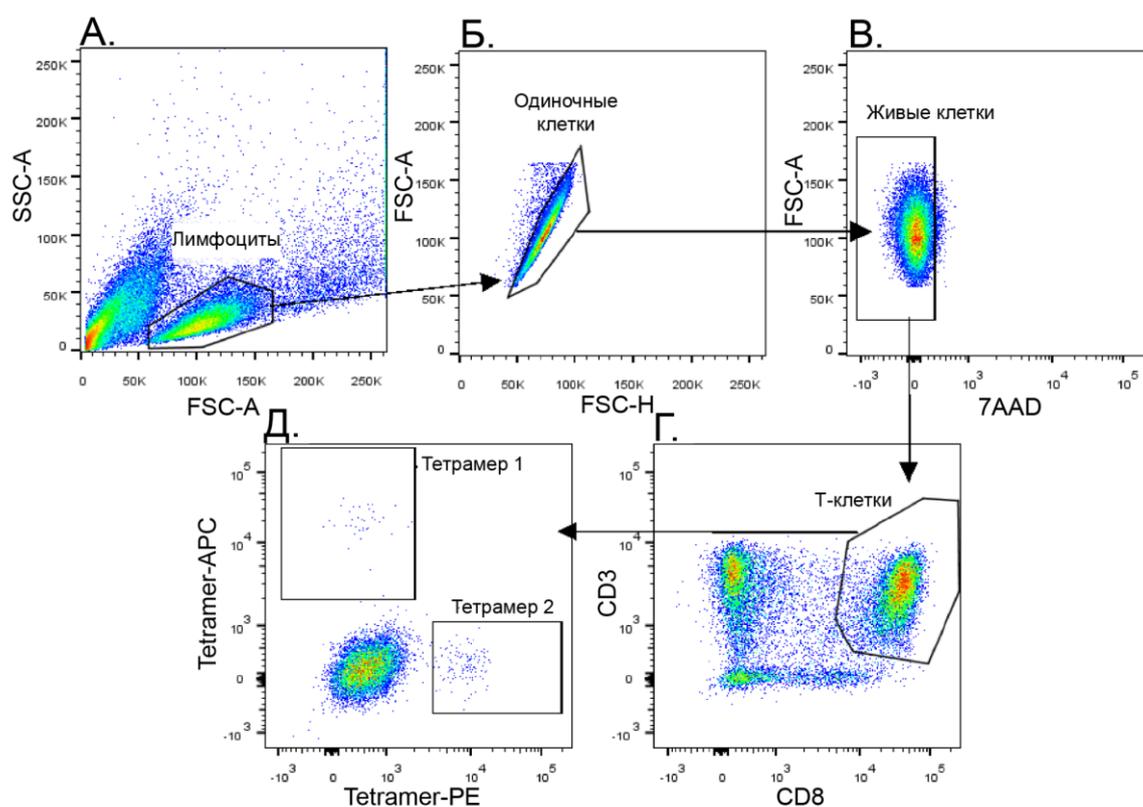


Рисунок 8. Стратегия выделения эпитоп-специфичных Т-клеток.

А. Популяцию лимфоцитов выделяли на основе прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) рассеивания.

Б. Одиночные события выделяли на основе площади и высоты сигнала FSC.

В. Живые клетки выделяли по FSC-A и отсутствию окраски маркером жизнеспособности 7AAD.

Г. Т-клетки выделяли по окраске на маркеры CD3 и CD8.

Д. Антиген-специфичные клетки детектировали по наличию окраски МНС-тетрамером, конъюгированным с PE или APC.

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.

В BT1 12/15 (80%) протестированных эпитопов были иммуногенными, при этом на 11/15 (73,3%) из них эпитоп-специфичный ответ был обнаружен у более, чем 50% доноров. Шесть эпитопов (YLQ, ALW, LLY, KCY, KTF, и MEV) 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 (Рис.9А). У здоровых доноров с релевантной аллелью слабый ответ был обнаружен только на один эпитоп - LLY.

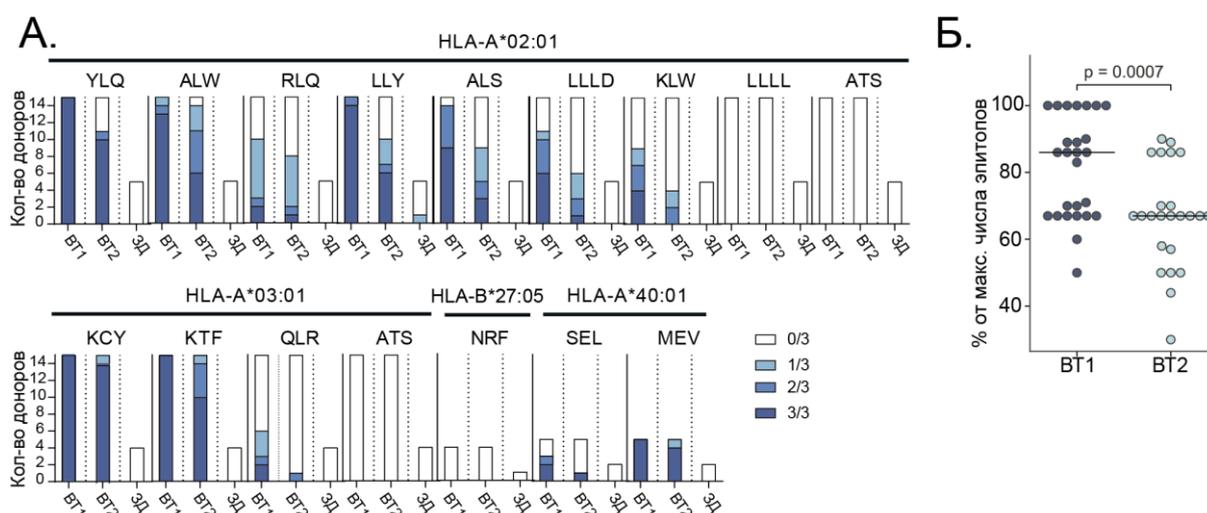


Рисунок 9. Частота эпитоп-специфичных Т-клеток у здоровых (ЗД) и переболевших SARS-CoV-2 донорах.

А. Количество лунок, содержащих эпитоп-специфичные CD8+ Т-клетки после *in vitro* экспансий из лимфоцитов ПД (N = 26) и ЗД (N = 7). Высота столбика отражает количество доноров, протестированных на каждый эпитоп. Интенсивность цвета указывает на количество лунок, содержащих МНС-тетрамер+ клетки. Трех- и четырехбуквенные сокращения названий эпитопов и их HLA аллели рестрикции приведены над соответствующими столбиками.

Б. Доля распознанных эпитопов от общего числа эпитопов, представляющихся в аллелях ПД. Каждая точка отражает одного донора; наличие МНС-тетрамер+ клеток хотя бы в одной лунке считается положительным ответом. Парный тест Манна-Уитни, значение р указано сверху.

Через восемь месяцев (ВТ2) 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.9Б)**.

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).

Снижение частоты специфичных Т-клеток было скорее характеристикой донора, чем эпитопа. 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 ВТ2 **(Рис.10)**.

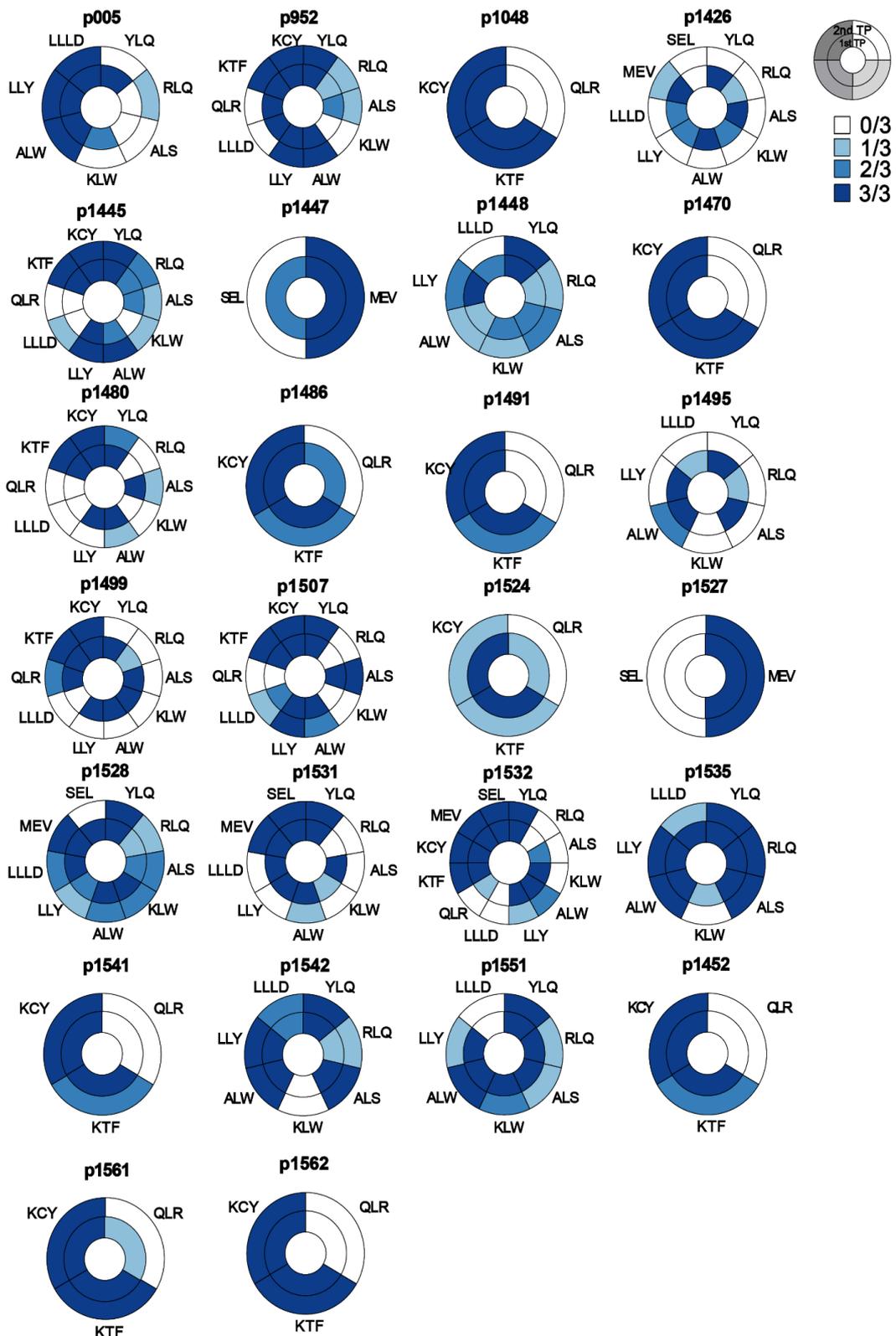


Рисунок 10. Изменение частоты эпитоп-специфичных Т-клеток.

Изменение частоты антиген-специфичных клеток после *in vitro* экспансий в BT1 (внутренний круг) по сравнению с BT2 (внешний круг). Каждый сегмент соответствует эпитопу, обозначенному трех- или четырехбуквенным сокращением. Интенсивность цвета указывает на количество лунок, содержащих МНС-тетрамер⁺ клетки.

3.3. Высокое клональное разнообразие обеспечивает превалирующий эпитоп-специфичный ответ CD8+ Т-клеток

Мы проанализировали репертуар β цепей Т-клеточных рецепторов (ТКР β) МНС-тетрамер-положительных клеток и тотальных фракций периферических мононуклеаров крови при помощи секвенирования нового поколения. 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 (**Рис.11А**).

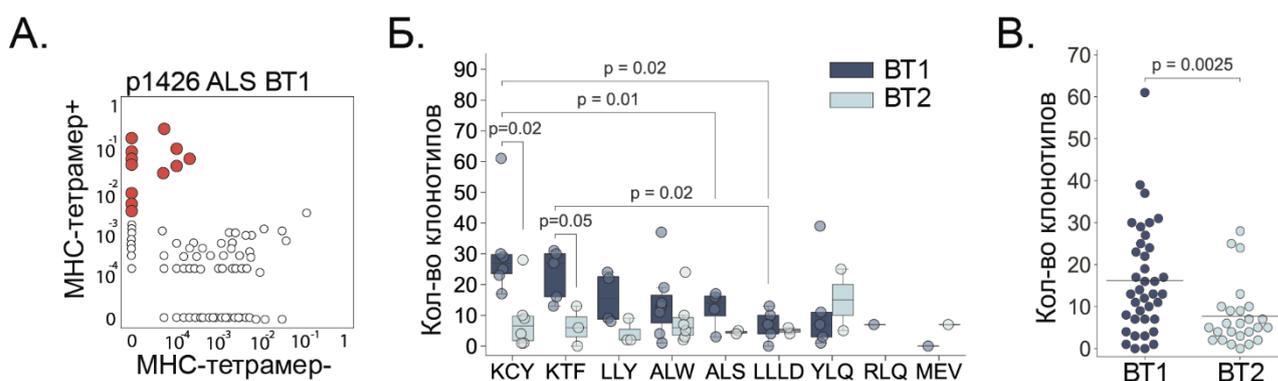


Рисунок 11. Количество SARS-CoV-2 -специфичных клонотипов снижается со временем.

А. Репрезентативный график обогащения МНС-тетрамер+ клонов.

Б. Количество клонотипов для каждого эпитопа в ВТ1 (синий) и ВТ2 (голубой).

В. Количество эпитоп-специфичных клонотипов у ПД (N = 14), где каждая точка представляет уникальную комбинацию пациент-эпитоп (медианы показаны горизонтальной линией).

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.11Б**). Эпитопы, для которых была характерна наибольшая клональность, также отличались наибольшей частотой CD8 Т-клеток (**Рис.9А**).

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. Изначальное различие в количестве

клонотипов между эпитопами стало менее заметным в ВТ2 (**Рис.11Б**). Общая медиана количества клонотипов для всех эпитопов снизилась с 13 в ВТ1 до 5 в ВТ2 (**Рис.11В**). Тем не менее, для всех эпитопов, кроме RLQ, во второй временной точке были обнаружены эпитоп-специфичные клоны.

Мы не нашли корреляции между клональным разнообразием Т-клеток в ВТ1 и ВТ2 (**Рис.12А**). Однако несмотря на то, что число клонотипов сокращалось даже у эпитопов, ответ на которые детектировался в трех лунках из трех, разнообразие клонального ответа было связано с лучшим сохранением эпитоп-специфичного ответа (**Рис.12Б**). 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.12В**).

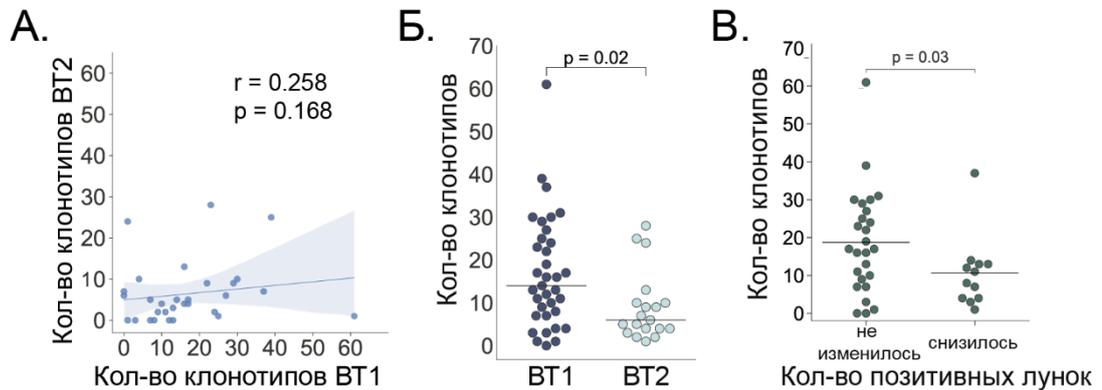


Рисунок 12. Изначальное клональное разнообразие влияет на сохранение эпитоп-специфичного ответа, но не на количество персистирующих клонов.

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 небольшая часть клонотипов достигала частоты больше $>10^{-4}$. Тем не менее, эпитопы, для которых доминантный ответ сохранялся в ВТ2 (КСУ, КТФ, YLQ и ALW), имели большее число клонотипов в ВТ1 (**Рис.13А**).

Нами не было обнаружено корреляции между размером клонотипов в ВТ1 и их наличием или размером в ВТ2 (Рис.13Б).

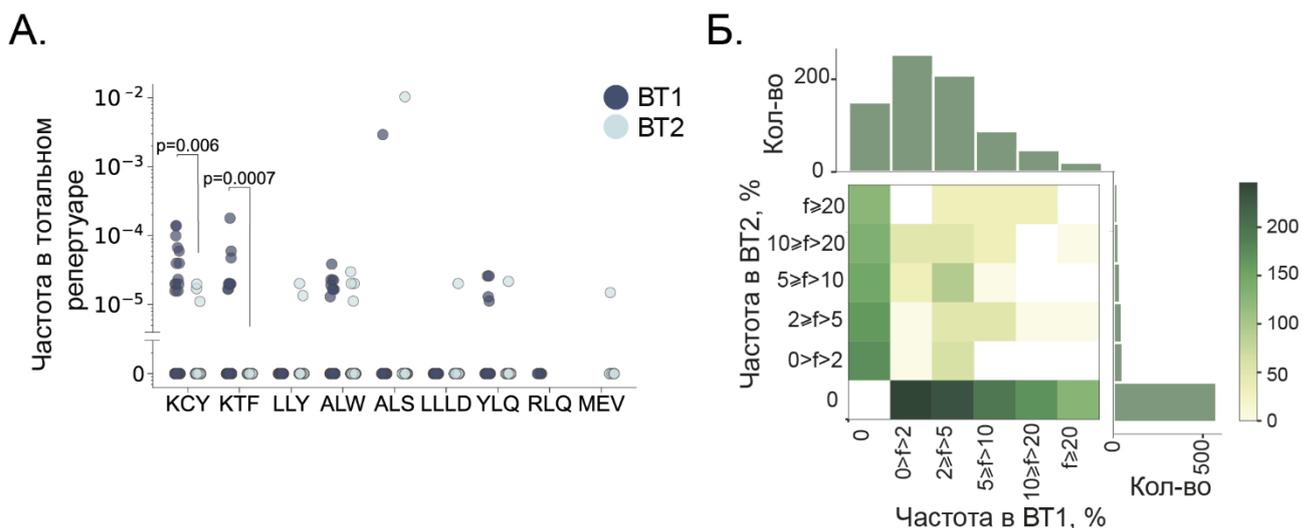


Рисунок 13. Эпитоп-специфичные клоны характеризуются низкой частотой в тотальном репертуаре.

А. Частота эпитоп-специфичных клонотипов в крови в ВТ1 (темно-синий) и ВТ2 (светло-синий).

Б. Частота (f) эпитоп-специфичных клонотипов в экспансиях. Цвет отражает количество клонотипов в каждой ячейке.

Тест Манна-Уитни, значения p указаны только там, где была достигнута статистическая значимость ($p<0,05$).

Клональный репертуар эпитоп-специфичных CD8⁺ 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. Чтобы оценить вероятность того, что такое маленькое пересечение связано с жесткими критериями специфичности, нами был проведен поиск эпитоп-специфичных клонотипов из ВТ1 в МНС-тетрамер-положительной фракции из ВТ2 и наоборот. Это позволило выделить еще 45 дополнительных клонотипов, таким образом увеличив долю пересекающихся клонотипов до 11,2%. Как уже было сказано ранее, эпитоп-специфичные клоны занимали очень маленькую долю тотального репертуара: 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% (Рис.14).

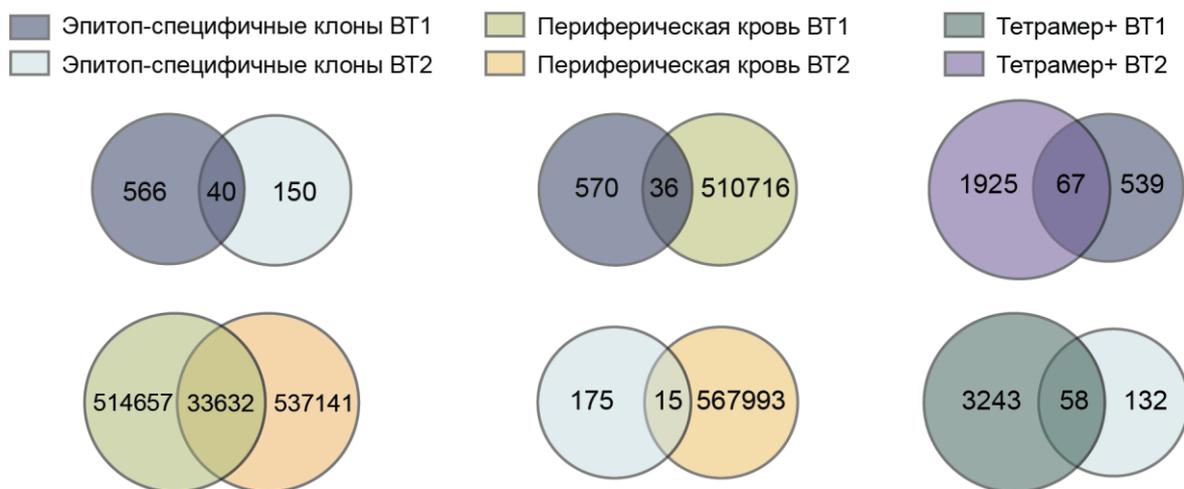


Рисунок 14. Пересечения клонотипов из различных фракций клеток.

Диаграммы Венна отображают пересечения количества эпитоп-специфичных клонотипов из VT1 (синий), VT2 (голубой), тотальных фракций периферической крови из VT1 (зеленый) и VT2 (желтый), фракций МНС-тетрамер - положительных фракций из VT1 (темно-зеленый) и VT2 (фиолетовый).

У каждого донора было обнаружено от 0 до 5 (медиана = 1,5) клонотипов, пересекающихся между двумя временными точками. Мы не обнаружили зависимости между стойкостью эпитоп-специфичного ответа и частотой клонотипов в тотальном репертуаре в VT1: только 8 клонотипов, обнаруженных в обеих временных точках, были также найдены в тотальных репертуарах (Рис.15).

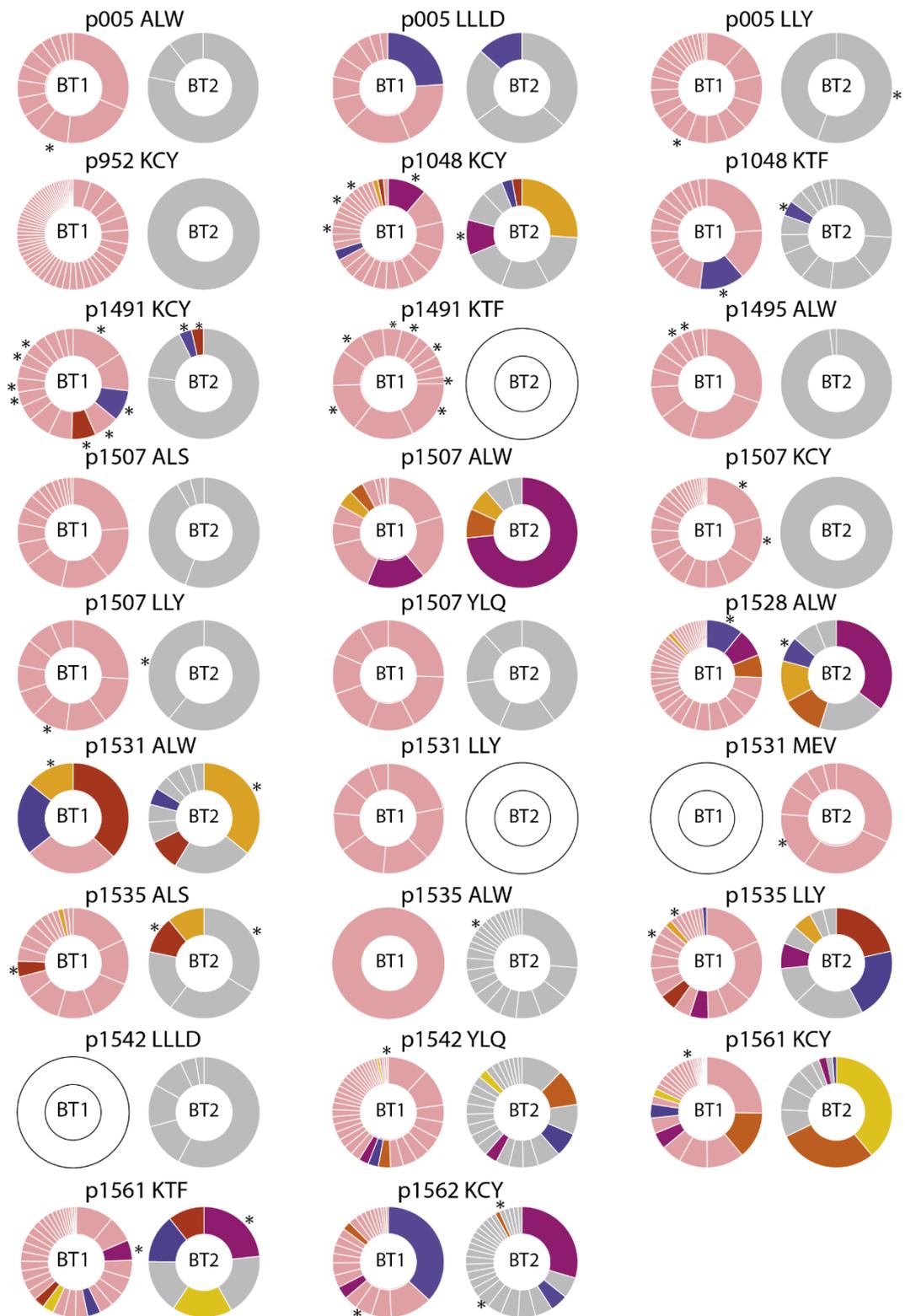


Рисунок 15. Изменение клонального состава эпитоп-специфичной фракции CD8 Т-клеток.

Круговые диаграммы отражают долю клонотипов из BT1 (слева) и BT2 (справа). Розовым цветом обозначены клонотипы, обнаруженные только в BT1, серым - только в BT2, другие цвета соответствуют клонотипам, обнаруженным в обе временные точки. Звездочками отмечены клонотипы, обнаруженные в тотальных репертуарах.

3.4. 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 β . 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 (**Рис.16А**). Наименее схожими оказались клонотипы, специфичные для KTF и KCY: в состав кластеров вошло всего 10,7% и 6,2% клонотипов, соответственно, в то время как в LLY-специфичные кластеры вошло 59,7% клонотипов (**Рис.16Б**).

Другой характеристикой ТКР является уровень публичности клонов - количество одинаковых аминокислотных последовательностей CDR3 β , обнаруженных у разных людей. Из 715 уникальных специфичных к эпитопам ALS, ALW, KCY, KTF, LLLD, LLY и YLQ клонотипов 19 были публичными, т.е. одна и та же аминокислотная последовательность CDR3 β была общей для 2-4 человек в когорте (некоторые последовательности кодировались разными нуклеотидами у одного человека). 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.16В**).

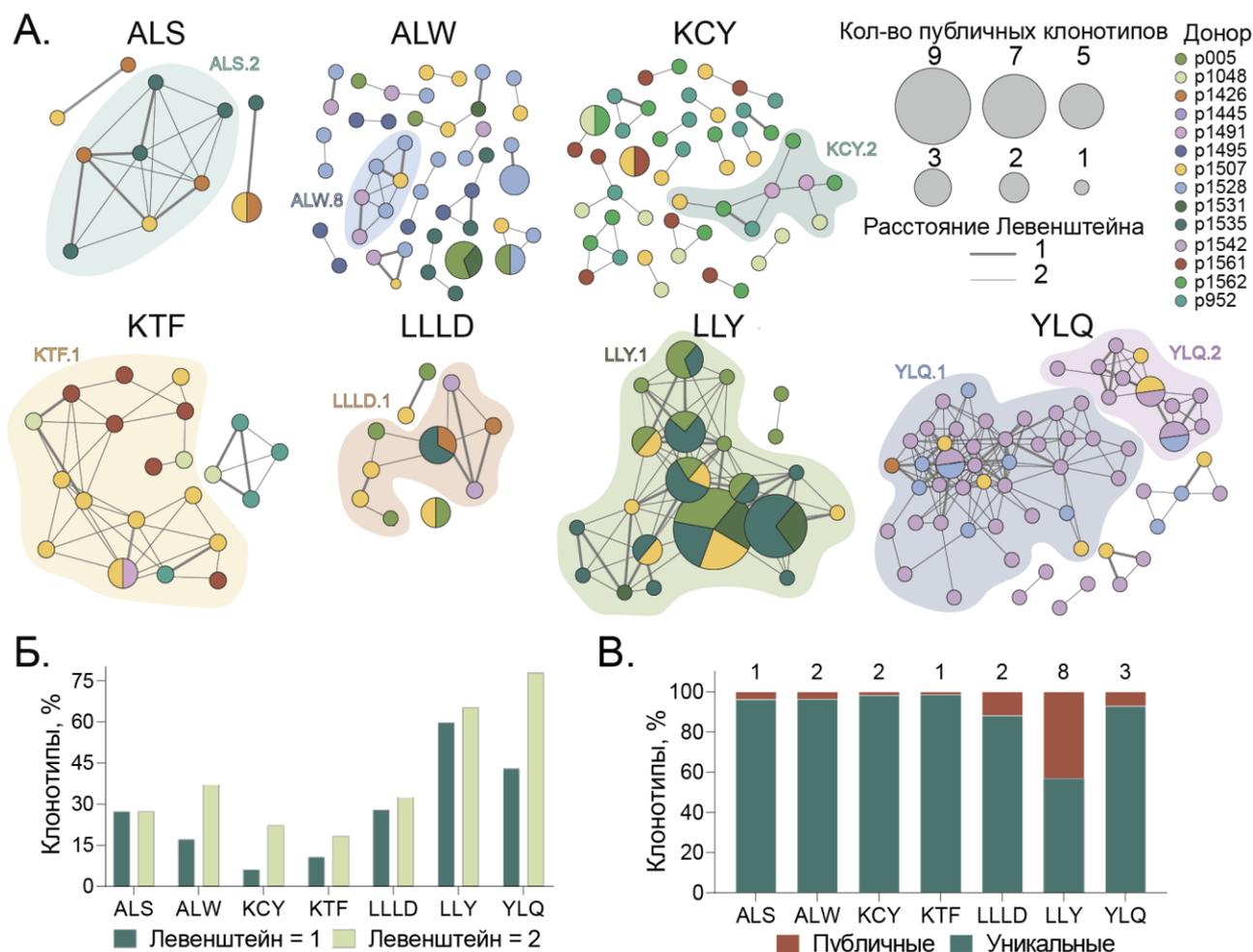


Рисунок 16. Клональная структура эпитоп-специфичного ответа на SARS-CoV-2.

А. Кластеризация последовательностей CDR3 β эпитоп-специфичных CD8⁺ Т-клеток. Каждый узел представляет собой аминокислотную последовательность уникальных или публичных последовательностей CDR3 β , где размер узла пропорционален количеству идентичных клонотипов. Линии соединяют схожие последовательности CDR3 β , где толщина указывает на расстояние Левенштейна = 1 или 2. Цвета обозначают доноров. Показаны только кластеры с двумя или более членами.

Б. Доля кластеризованных эпитоп-специфичных клонотипов Т-клеток.

В. Доля, занимаемая публичными (темно-красные) и уникальными (темно-зеленые) эпитоп-специфичными клонотипами. Количество публичных клонов, соответствующее размеру круга, указано сверху.

Для того, чтобы оценить специфичность CDR3 β , полученных в данной работе, мы использовали последовательности CDR3 β , аннотированные 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. 17А**). 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 β , которые были помечены как специфичные для других эпитопов SARS-CoV-2. Такое высокое сходство между областями CDR3 β , распознающими различные эпитопы, может быть объяснено высоким вкладом α -цепи Т-клеточного рецептора или распознаванием на основе зародышевой линии, опосредованным CDR1 и CDR2. Мы обнаружили, что 32% специфичных для ALW клонотипов, описанных в этом исследовании, были сходны с YLQ-специфичными последовательностями CDR3 β из базы данных MIRA. Следует отметить, что в базе данных MIRA к YLQ-специфичным последовательностям относятся не только последовательности, специфичные для пептида YLQPRTFLL, но и для пептидов YLQPRTFL и YYVGYLQPRTF. Высокая кросс-реактивность (т.е. расстояние Левенштейна ≤ 1 между последовательностями CDR3) наблюдалась для KCY, для которого 83 (26,9%) клонотипа, входящих в кластеры, имели последовательности CDR3 β с другой специфичностью. Большинство же YLQ- и KTF-специфичных последовательностей CDR3 β были сходны с последовательности из баз данных, аннотированных с той же специфичностью (**Рис.17Б**).

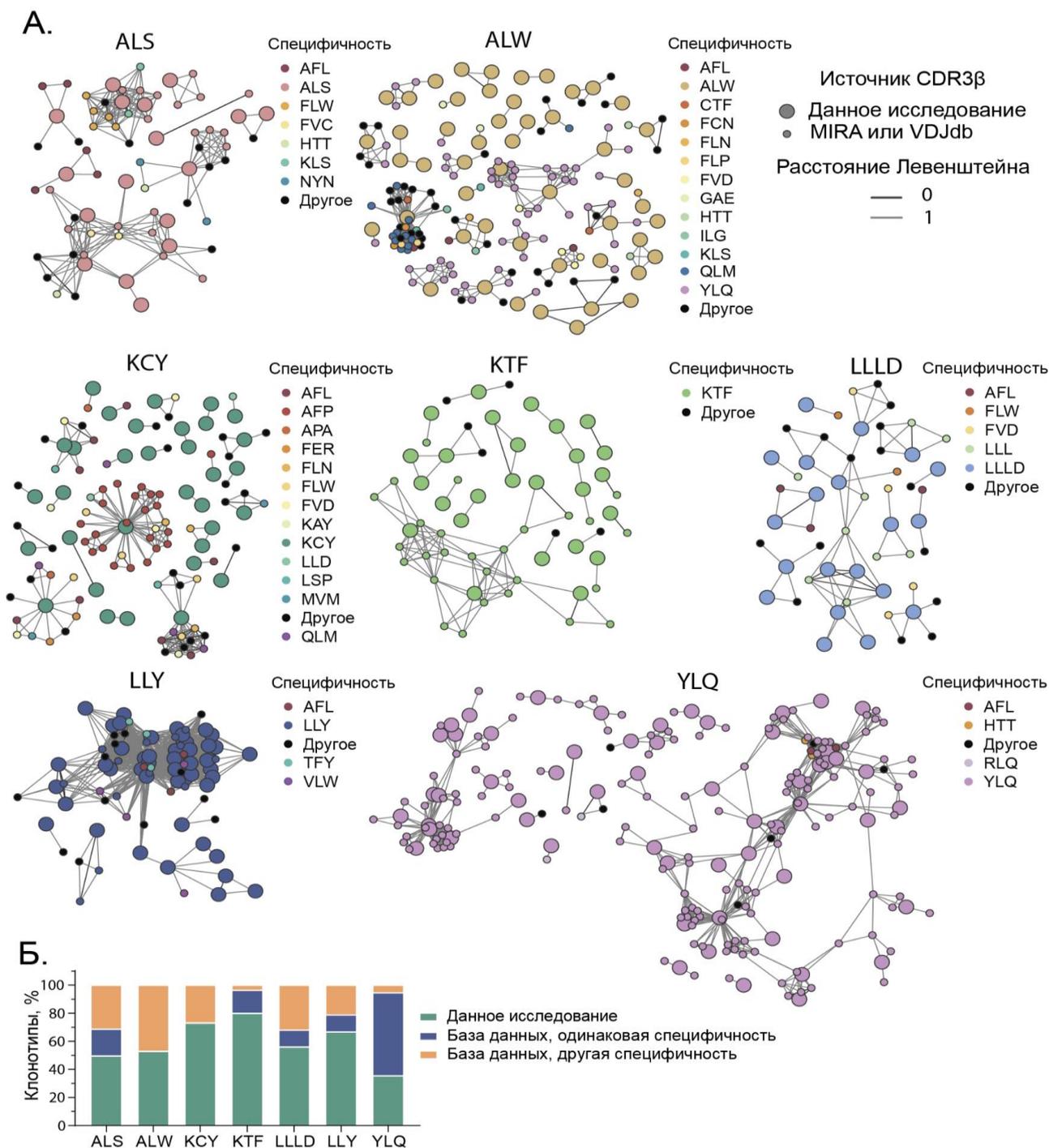


Рисунок 17. Кластеризация эпитоп-специфичных CDR3 β с различными уровнями сходства.

А. Узлы представляют отдельные последовательности CDR3 β . Линии связывают группы похожих последовательностей на расстоянии Левенштейна 1 (серый) или 0 (черный). Цвета обозначают эпитопы, размер указывает на CDR3 из текущего исследования (большой) или из MIRA и VDJdb (маленький). Показаны только кластеры с двумя или более членами.

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

Клонотипы, специфичные для большинства эпитопов SARS-CoV-2, полученные в этом исследовании, в основном имели длину 13-15 аминокислот (АК), исключение составили только эпитопы ALW и LLY. Специфичные для ALW клонотипы имели самые длинные CDR3 β , причем большая часть имела длину 16 АК; большинство специфичных для LLY клонотипов же, напротив, имели CDR3 β длиной 12 АК. Мы не обнаружили YLQ-специфичных клонов с длиной 12 и 15 АК (**Рис. 18**). Это можно объяснить их редкостью: CDR3 β такой длины имели всего в 2,2% и 5% соответственно из 821 YLQ-специфичных последовательностей CDR3 β , аннотированных в VDJdb.

Помимо длины клонотипы также различались частотой использования определенных V и J генов. Например, короткие (12-14 АК) LLY-специфичные клонотипы чаще всего состояли из TRBV11-3 и TRBV11-2, в то время как YLQ-клонотипы с CDR3 β длиной 13 АК были сформированы с помощью большого разнообразия TRBV генов. Однако, как LLY-, так и YLQ-специфичные клонотипы характеризовались сильным преобладанием определенных J-генов: TRBJ1-1 и TRBJ2-2, соответственно (**Рис. 18**). Высокое разнообразие используемых V-генов, характерное для YLQ клонов, может быть объяснено существенной ролью α -цепи ТКР в распознавании эпитопов, как было продемонстрировано ранее (Wu et al., 2022).

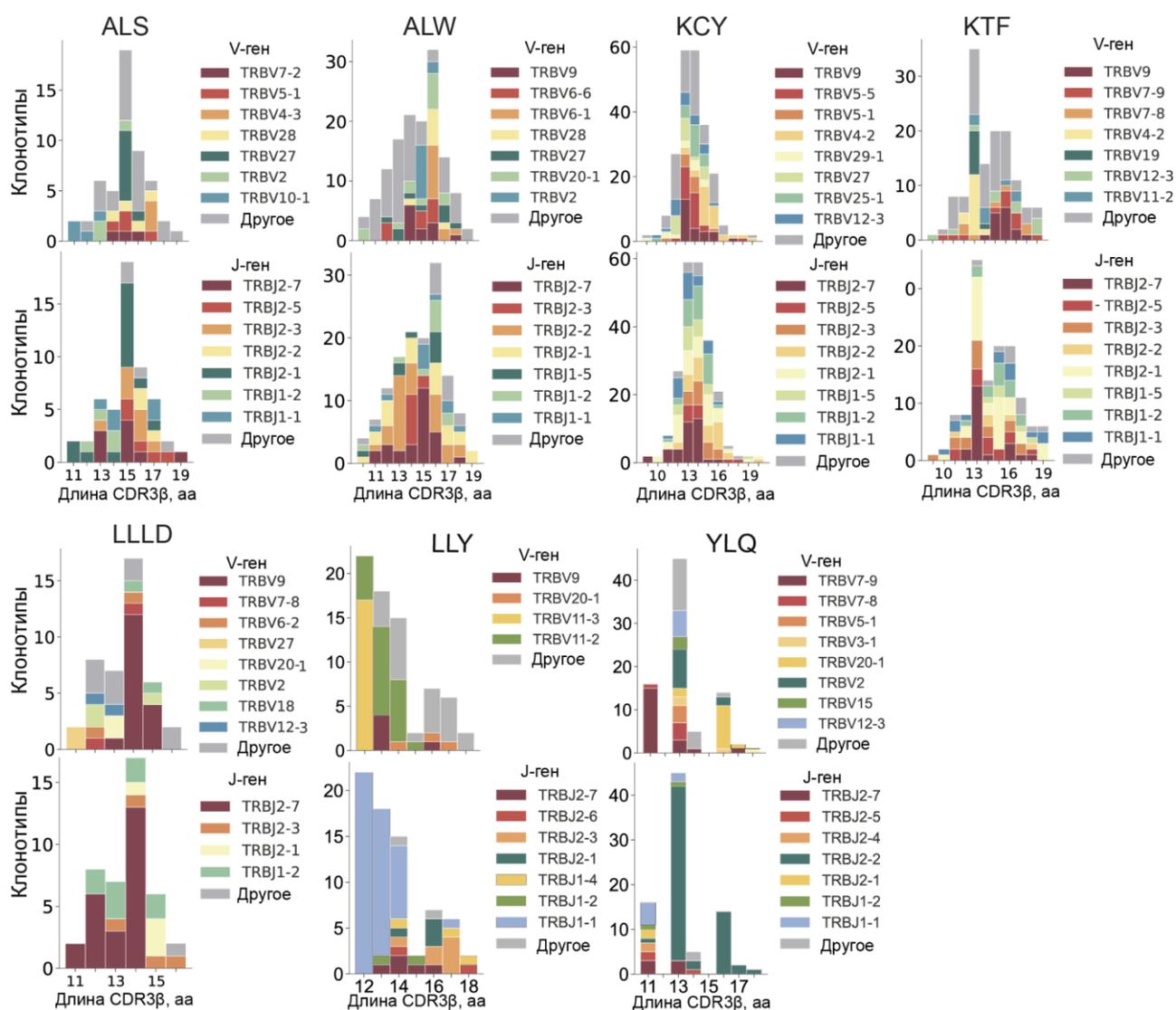


Рисунок 18. Использование V- и J- генов в CDR3 β эпитоп-специфичных клонотипов.

Гистограммы использования V-генов (верхние графики) и J-генов (нижние графики) в CDR3 β различной длины.

Позиционно-весовые матрицы наиболее представленных длин CDR3 β продемонстрировали большее разнообразие для YLQ -специфичных последовательностей по сравнению с LLY- специфичными TCR β (Рис.19). YLQ-специфичные клонотипы длиной 11 (из кластера YLQ.2, номера кластеров указаны на Рис.16А) или 13 АК (из кластера YLQ.1) имели те же мотивы CDR3, что и описанные нами ранее (Shomuradova et al., 2020). LLY-специфичные клоны длиной 14 АК содержали мотив CDR3 CASS[LFA]G[TS]G[GS][TN]EAF, описанный ранее (Francis et al., 2022), в то время как клоны с длиной 12 и 13 АК содержали ранее не описанные мотивы CASS[LF]G[GS][TASVE][EG]AFF и

CASS[LVYI][SGAE]GSTEAFF, соответственно. Более того, мы обнаружили мотивы CDR3 β , распознающие ALS, ALW, KCY, KTF и LLLD, также не описанные ранее (Рис.19).

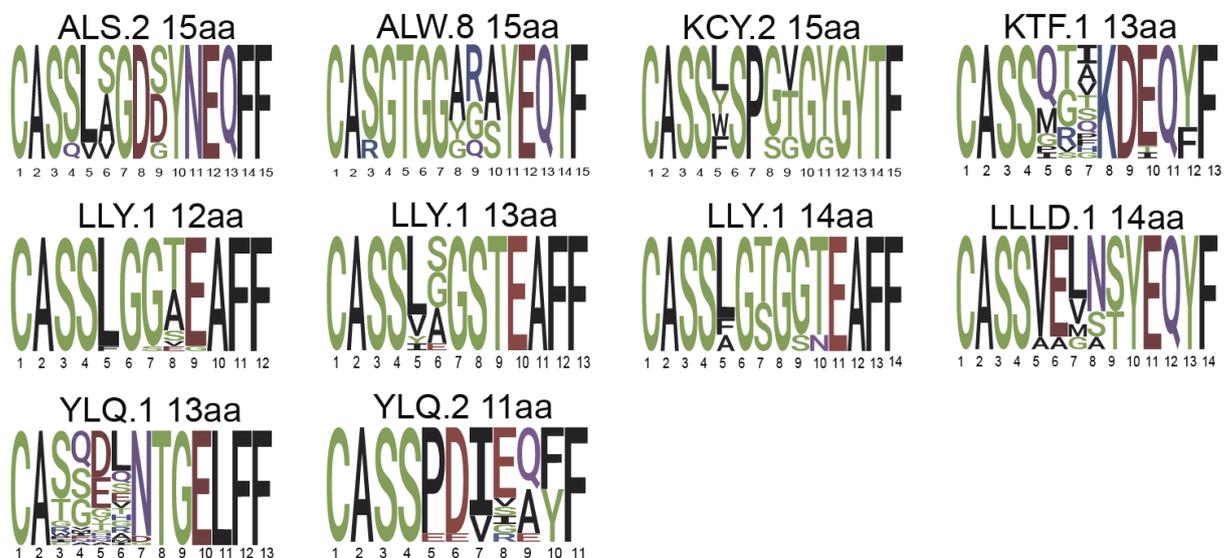


Рисунок 19. Позиционно-весовые матрицы.

Позиционно-весовые матрицы последовательностей CDR3 β наиболее распространенных длин, входящих в кластеры, специфичные для эпитопов. Номера кластеров соответствуют номерам, указанным на рис. 14А.

Одной из характеристик Т-клеточного рецептора является вероятность его сборки в процессе V(D)J-рекомбинации, которая описывается параметром Pgen. Для каждого эпитоп-специфичного репертуара с помощью алгоритма OLGA (Sethna et al., 2019) была рассчитана величина Pgen. В качестве контроля были использованы 31874 аннотированных в базе VDJdb последовательности CDR3 β , 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. Среднее значение Pgen для LLY-специфичных клонотипов составляло около $1,97 \times 10^{-8}$, а медианное значение Pgen для этого эпитопа было $5,16 \times 10^{-9}$, в то время как для контрольного набора эти значения составляли $4,27 \times 10^{-9}$ и $1,39 \times 10^{-10}$ соответственно (Рис.20). Этим можно объяснить высокое сходство LLY-

специфичных клонотипов и большое количество публичных последовательностей CDR3 β .

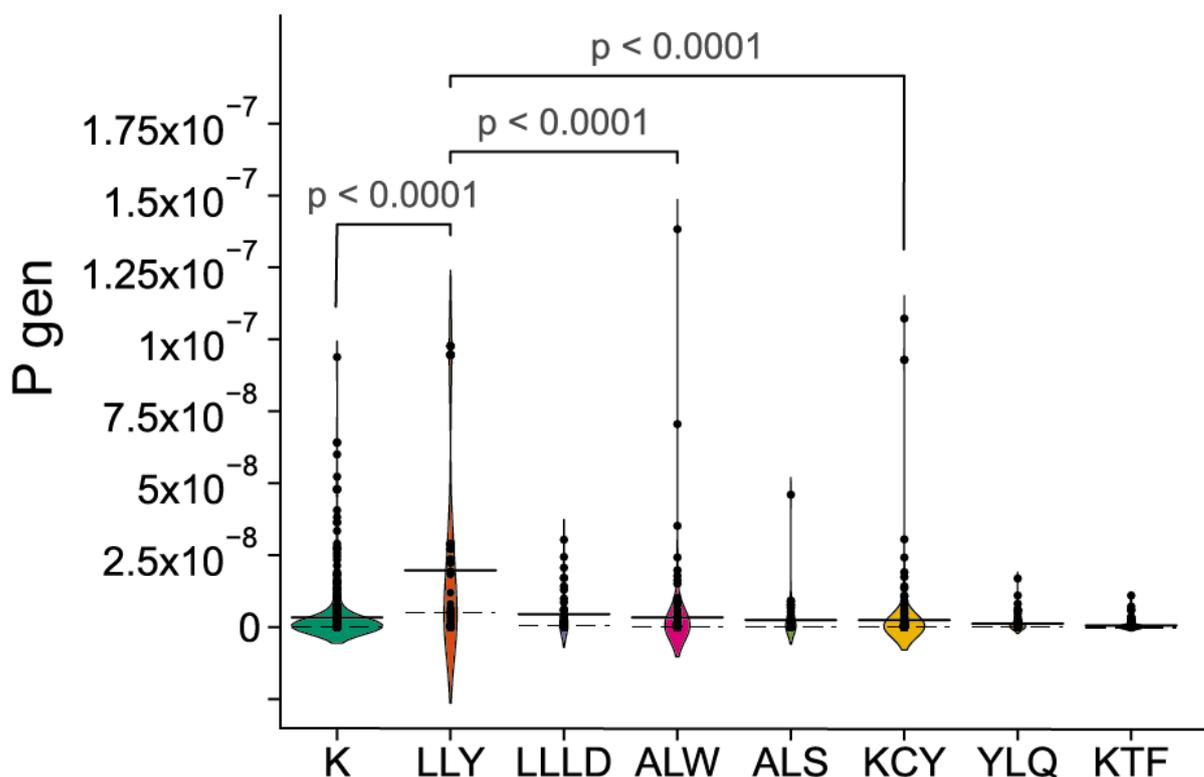


Рисунок 20. Вероятность V(D)J-рекомбинации эпитоп-специфичных CDR3 β .

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. K - контрольная выборка из 31874 ЦМВ-, ВЭБ- и грипп А-специфичных CDR3 β (на рисунке отображены только значения P gen для 500 случайных CDR3 β).

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. 21**). Это подчеркивает важность индукции поликлонального ответа для формирования долговременной Т-клеточной памяти.

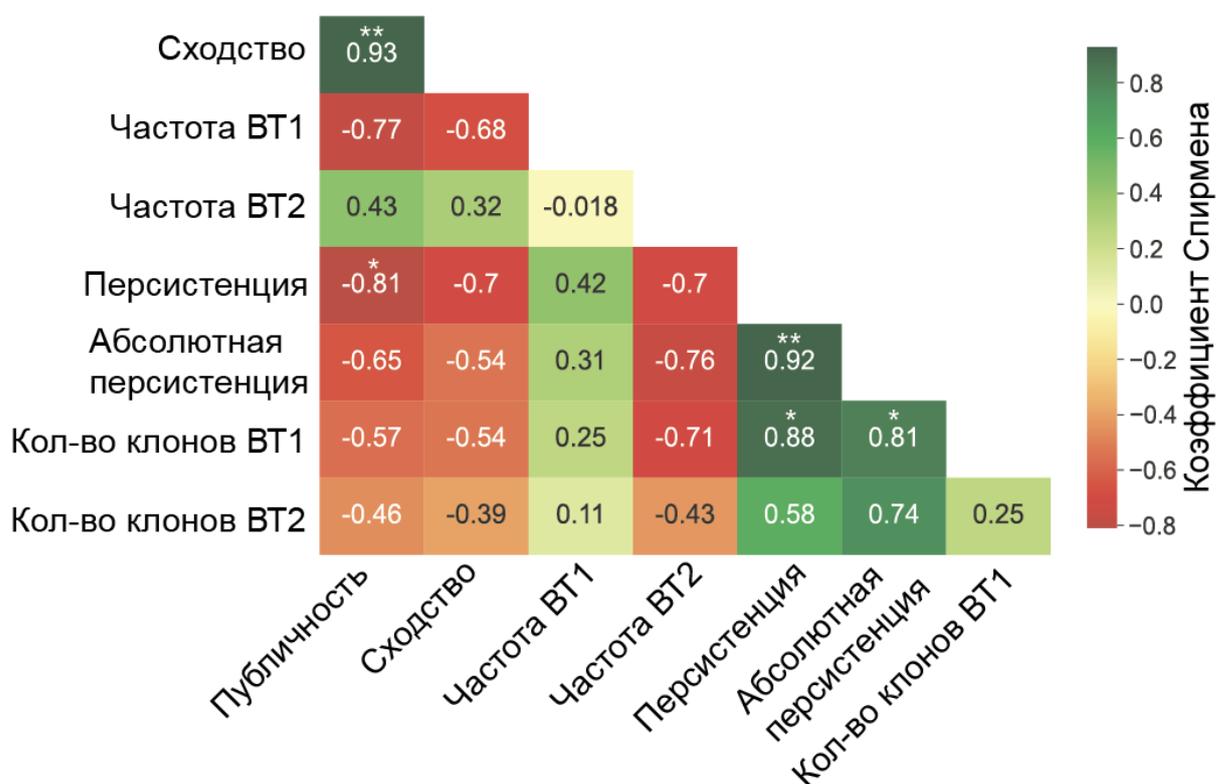


Рисунок 21. Влияние различных характеристик Т-клеточного репертуара на сохранность ответа во времени.

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

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

Глава 4. Обсуждение результатов

Появление в конце 2019 года нового вируса SARS-CoV-2 и его быстрое распространение по миру позволило ученым всего мира сосредоточиться на изучении всех аспектов противостояния патогена и иммунной системы человека. Основными темами для исследований стали поиск антигенов, на которые возникает иммунный ответ, и оценка вклада кросс-реактивного иммунного ответа в защиту от заражения. Первые работы были посвящены гуморальному ответу на вирус (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). Было показано, что уровень повторных заражений тем же штаммом был крайне низким (Flacco et al., 2022), что дало толчок для разработки вакцин. Высокая частота мутаций и появление новых штаммов вируса стимулировали исследования стойкости иммунного ответа и эффективности его против новых штаммов. Стало понятно, что изучение различных характеристик Т-клеточного ответа на вирусную инфекцию, может пролить свет на принципы, лежащие в основе эффективного иммунного ответа в целом.

В нашей работе мы также сфокусировались на изучении стойкости гуморального и клеточного иммунных ответов на SARS-CoV-2. Для этого были проанализированы парные образцы крови 50 переболевших доноров, собранные через 17-72 дня и 180-292 дня после заражения. В предыдущих исследованиях было показано, что на ранних стадиях после выздоровления Т-клеточный ответ детектируют у большего числа доноров, по сравнению с гуморальным (Nelde et al., 2021; Oberhardt et al., 2021; Silva Antunes da et al., 2021). Результаты нашего исследования полностью согласуются с этими данными. Помимо этого, мы показали, что у большинства серонегативных индивидуумов имеется детектируемый Т-клеточный ответ на один или несколько вирусных антигенов. Таким образом, можно сделать вывод, что Т-клетки служат более надежным маркером перенесенной инфекции COVID-19, нежели антитела.

В других работах, посвященных изучению стойкости иммунного ответа на SARS-CoV-2, было показано, что среднее время исчезновения антител и Т-клеточного ответа составляло 6-8 месяцев и 10-15 месяцев, соответственно (Dan et al., 2021; Sherina et al., 2021; Marcotte et al., 2022). Мы также обнаружили, что через 8 месяцев после заболевания иммунный ответ на вирус снижается. В нашей работе было показано, что гуморальный ответ является менее стойким: клеточный иммунитет против SARS-CoV-2 был обнаружен у подавляющего большинства взрослых через 8 месяцев после перенесения заболевания в легкой и умеренной форме, что также было показано в работе Jung и соавт. (Jung et al., 2021), тогда как антитела детектировались лишь у 58% доноров (**Рис.2**).

Из трех структурных антигенов вируса (S-, M- и N-белков), рассмотренных в нашей работе, согласно литературным данным, N-белок был наименее иммуногенным (Shomuradova et al., 2020; Thieme et al., 2020; Titov et al., 2022), а ответ на него - наименее стабильным. Это также было обнаружено в нашей работе (**Рис.2Б**).

Несмотря на то, что во многих исследованиях сообщается о сильной корреляции гуморального ответа с частотой Т-клеток (Chen et al., 2021; Molodtsov et al., 2022), существуют работы, в которых такой корреляции не было обнаружено (Топтыгина и др., 2022). Мы также не обнаружили корреляцию между индексом позитивности IgG антител против RBD и ответом Т-клеток (**Рис.4**), что может быть объяснено какими-то особенностями антигена RBD.

Центральным аспектом нашей работы был анализ ответа CD8⁺ Т-клеток на отдельные эпитопы SARS-CoV-2 на уровне репертуара Т-клеточных рецепторов. Мы исследовали Т-клетки, специфичные к 15 иммуногенным эпитопам, известным по литературным данным, на образцах 26 доноров. Для того, чтобы подтвердить иммуногенность этих эпитопов, а также выделить Т-клеточные клоны и описать структуру антиген-специфичного репертуара, мы использовали высокочувствительный метод — *ex vivo* Т-клеточную экспансию. Количество лунок, содержащих после экспансии МНС-тетрамер положительные Т-клетки, использовали в качестве суррогатного маркера частоты Т-клеток. В нашем

исследовании мы не подтвердили иммуногенность ранее описанных эпитопов LLLLD, ATS и NRF. Остальные же эпитопы различались по своей иммуногенности: 11 были иммунодоминантными с ответом, детектируемым в более чем 50% доноров. Только один эпитоп (LLY) дал ответ у здорового донора, что согласуется с другой работой (Francis et al., 2022), где также было показано, что этот эпитоп является кросс-реактивным и может вызывать иммунный ответ в людях, не контактировавших с инфекцией (**Рис.9А**).

Наличие специфичных к SARS-CoV-2 В- и Т-клеток памяти у большинства пациентов, наблюдается в течение 6-15 месяцев после инфекции и начинает снижаться только через 12-15 месяцев (Marcotte et al., 2022). В некоторых случаях Т-клетки памяти могут быть обнаружены и через 17 лет после перенесения инфекции, что было показано для вируса SARS-CoV-1 (Bert le et al., 2020). В нашей работе мы получили аналогичные результаты. Через 180-292 дня (6-9 месяцев) после заражения эпитоп-специфичные Т-клетки все еще обнаруживались в крови исследуемых доноров, хотя количество распознанных эпитопов также как количество и частота обнаруживаемых эпитоп-специфичных клонотипов, уменьшились (**Рис.9**). 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 KLW) 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.

В рамках исследования клонального разнообразия SARS-CoV-2 специфичных Т-клеточных рецепторов мы описали 715 уникальных клонотипов. Некоторые эпитопы имели высокое клональное разнообразие (например, у KCY в сумме по всем донорам было 223 уникальных клонотипа, а у KTF - 130), в то время как другие эпитоп-специфичные ответы были значительно менее разнообразны (**Рис.11Б**). Тем не менее, уменьшение числа клонов со временем было характерно даже для поликлональных ответов. Более того, уменьшение

числа клонотипов через 8 месяцев после инфекции было продемонстрировано даже для тех эпитопов, выраженный ответ на которые сохранялся у большого числа доноров, хотя в общем случае клональность ответа коррелировала с сохранением клеток в крови (**Рис.20**). Наиболее ярким подтверждением этого факта были эпитопы KTF и KCY, которые характеризовались как наибольшим количеством специфических клонотипов на одного пациента, так и наиболее стойким ответом. Таким образом, можно сказать, что не размер клонов, а поликлональность иммунного ответа способствует длительному персистированию Т-клеток памяти в крови. Ранее этого не было продемонстрировано для SARS-CoV-2-специфичного ответа в работах, посвященных репертуарам ТКР (Shomuradova et al., 2020; Francis et al., 2022; Minervina et al., 2022). В случае других заболеваний было показано, что более разнообразный репертуар ТКР может обеспечивать защиту от более широкого спектра антигенов (Miconnet et al., 2011; Dash et al., 2017) благодаря своей avidности и аффинности (Price et al., 2005; Zehn et al., 2009). Возможно, такой же принцип справедлив и для SARS-CoV-2, однако это требует дальнейшего прицельного изучения.

Анализируя изменение клонального состава эпитоп-специфичного иммунного ответа во времени, мы обнаружили очень небольшое пересечение эпитоп-специфичных клонов между двумя временными точками (**Рис.13А, Рис.14**). Вероятно, это связано с тем, что репертуар Т-клеток очень динамичен и претерпевает серьезные изменения в течение 6-9 месяцев, а также с тем, что клетки, специфичные для SARS-CoV-2, занимают очень небольшую долю репертуара, и вероятность получения одних и тех же клонов в небольшом образце взятой у донора крови невелика.

В нашей работе мы показали, что структура эпитоп-специфичного ответа различалась между эпитопами (**Рис.16**). Эпитоп LLY распознавался Т-клеточными рецепторами, которые характеризовались наибольшим уровнем публичности: на долю этого эпитопа пришлось 8 из 19 публичных последовательностей CDR3 β , в то время как остальные эпитопы отличались

значительно меньшим количеством специфических ТКР, пересекающихся между донорами. LLY-специфичный репертуар имеет такую структуру вероятнее всего из-за относительно коротких последовательностей CDR3 с высокой вероятностью V(D)J-рекомбинации (Pogorelyu et al., 2018), что может быть ассоциировано с эффективным иммунным ответом (Zhao et al., 2016; Chang et al., 2021; Park et al., 2021).

Суммируя, в нашей работе был проведен анализ динамики иммунного ответа на вирус SARS-CoV-2 и исследование того, как различные характеристики Т-клеточного иммунного ответа влияют на его сохранность.

Выводы

1. Через 8 месяцев после инфекции COVID-19 медиана уровня IgG антител к RBD белку снижается в 2 раза, а медиана количества Т-клеток, продуцирующих интерферон-гамма 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⁺ 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⁺ Т-клеток.

4. Разнообразие репертуара эпитоп-специфичных CD8⁺ Т-клеток способствует длительному персистированию Т-клеток памяти, специфичных к этому эпитопу. Размер, занимаемый клонотипом, не оказывает влияния на длительность его персистирования в крови.

Список литературы

1. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Закиров Р.Ш., Афридонова З.Э. Сопоставление гуморального и клеточного иммунитета у переболевших COVID-19//Инфекция и иммунитет. 2022, Т. 12, № 3, с. 495–504
2. Agerer B., Koblischke M., Gudipati V., Montaña-Gutierrez L.F., Smyth M., Popa A., Genger J.-W., Endler L., Florian D.M., Mühlgrabner V., Graninger M., Aberle S.W., Husa A.-M., Shaw L.E., Lercher A., Gattinger P., Torralba-Gombau R., Trapin D., Penz T., et al. SARS-CoV-2 mutations in MHC-I-restricted epitopes evade CD8⁺ T cell responses // *Science Immunology*. 2021. V. 6. № 57.
3. Alter G., Yu J., Liu J., Chandrashekar A., Borducchi E.N., Tostanoski L.H., McMahan K., Jacob-Dolan C., Martinez D.R., Chang A., Anioke T., Lifton M., Nkolola J., Stephenson K.E., Atyeo C., Shin S., Fields P., Kaplan I., Robins H., et al. Immunogenicity of Ad26.COV2.S vaccine against SARS-CoV-2 variants in humans // *Nature*. 2021. V. 596. № 7871. P. 268–272.
4. Alves Sousa A. de P., Johnson K.R., Ohayon J., Zhu J., Muraro P.A., Jacobson S. Comprehensive Analysis of TCR- β Repertoire in Patients with Neurological Immune-mediated Disorders // *Scientific Reports*. 2019. V. 9. № 1. P. 344.
5. Amraei R., Yin W., Napoleon M.A., Suder E.L., Berrigan J., Zhao Q., Olejnik J., Chandler K.B., Xia C., Feldman J., Hauser B.M., Caradonna T.M., Schmidt A.G., Gummuluru S., Muhlberger E., Chitalia V., Costello C.E., Rahimi N. CD209L/L-SIGN and CD209/DC-SIGN act as receptors for SARS-CoV-2 // *bioRxiv*. 2021. P. 2020.06.22.165803.
6. Andersen K.G., Rambaut A., Lipkin W.I., Holmes E.C., Garry R.F. The proximal origin of SARS-CoV-2 // *Nature Medicine*. 2020. V. 26. № 4. P. 450–452.
7. Asplund Högelin K., Ruffin N., Pin E., Månberg A., Hober S., Gafvelin G., Grönlund H., Nilsson P., Khademi M., Olsson T., Piehl F., Nimer F. al. Development of humoral and cellular immunological memory against SARS-

- CoV-2 despite B cell depleting treatment in multiple sclerosis // *iScience*. 2021. V. 24. № 9. P. 103078.
8. Bacher P., Rosati E., Esser D., Martini G.R., Saggau C., Schiminsky E., Dargvainiene J., Schröder I., Wieters I., Khodamoradi Y., Eberhardt F., Vehreschild M.J.G.T., Neb H., Sonntagbauer M., Conrad C., Tran F., Rosenstiel P., Markewitz R., Wandinger K.-P., et al. Low-Avidity CD4+ T Cell Responses to SARS-CoV-2 in Unexposed Individuals and Humans with Severe COVID-19 // *Immunity*. 2020. V. 53. № 6. P. 1258- 1271.e5.
 9. Bagaev D. v, Vroomans R.M.A., Samir J., Stervbo U., Rius C., Dolton G., Greenshields-Watson A., Attaf M., Egorov E.S., Zvyagin I. v, Babel N., Cole D.K., Godkin A.J., Sewell A.K., Kesmir C., Chudakov D.M., Luciani F., Shugay M. VDJdb in 2019: database extension, new analysis infrastructure and a T-cell receptor motif compendium // *Nucleic Acids Research*. 2020. V. 48. № D1. P. D1057–D1062.
 10. Bange E.M., Han N.A., Wileyto P., Kim J.Y., Gouma S., Robinson J., Greenplate A.R., Hwee M.A., Porterfield F., Owoyemi O., Naik K., Zheng C., Galantino M., Weisman A.R., Ittner C.A.G., Kugler E.M., Baxter A.E., Oniyide O., Agyekum R.S., et al. CD8+ T cells contribute to survival in patients with COVID-19 and hematologic cancer // *Nature Medicine*. 2021. V. 27. № 7. P. 1280–1289.
 11. Bassing C.H., Swat W., Alt F.W. The Mechanism and Regulation of Chromosomal V(D)J Recombination // *Cell*. 2002. V. 109. № 2. P. S45–S55.
 12. Berg S.P.H. van den, Derksen L.Y., Drylewicz J., Nanlohy N.M., Beckers L., Lanfermeijer J., Gessel S.N., Vos M., Otto S.A., Boer R.J. de, Tesselaar K., Borghans J.A.M., Baarle D. van. Quantification of T-cell dynamics during latent cytomegalovirus infection in humans // *PLOS Pathogens*. 2021. V. 17. № 12. P. e1010152.
 13. Bergamaschi L., Mescia F., Turner L., Hanson A.L., Kotagiri P., Dunmore B.J., Ruffieux H., Sa A. de, Huhn O., Morgan M.D., Gerber P.P., Wills M.R., Baker S., Calero-Nieto F.J., Doffinger R., Dougan G., Elmer A., Goodfellow I.G.,

- Gupta R.K., et al. Longitudinal analysis reveals that delayed bystander CD8+ T cell activation and early immune pathology distinguish severe COVID-19 from mild disease // *Immunity*. 2021. V. 54. № 6. P. 1257- 1275.e8.
14. Bert N. le, Tan A.T., Kunasegaran K., Tham C.Y.L., Hafezi M., Chia A., Chng M.H.Y., Lin M., Tan N., Linster M., Chia W.N., Chen M.I.-C., Wang L.-F., Ooi E.E., Kalimuddin S., Tambyah P.A., Low J.G.-H., Tan Y.-J., Bertolotti A. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls // *Nature*. 2020. V. 584. № 7821. P. 457–462.
 15. Bilich T., Nelde A., Heitmann J.S., Maringer Y., Roerden M., Bauer J., Rieth J., Wacker M., Peter A., Hörber S., Rachfalski D., Märklin M., Stevanović S., Rammensee H.-G., Salih H.R., Walz J.S. T cell and antibody kinetics delineate SARS-CoV-2 peptides mediating long-term immune responses in COVID-19 convalescent individuals // *Science Translational Medicine*. 2021. V. 13. № 590.
 16. Bonifacius A., Tischer-Zimmermann S., Dragon A.C., Gussarow D., Vogel A., Krettek U., Gödecke N., Yilmaz M., Kraft A.R.M., Hoepfer M.M., Pink I., Schmidt J.J., Li Y., Welte T., Maecker-Kolhoff B., Martens J., Berger M.M., Lobenwein C., Stankov M. v., et al. COVID-19 immune signatures reveal stable antiviral T cell function despite declining humoral responses // *Immunity*. 2021. V. 54. № 2. P. 340- 354.e6.
 17. Byazrova M., Yusubalieva G., Spiridonova A., Efimov G., Mazurov D., Baranov K., Baklaushev V., Filatov A. Pattern of circulating SARS-CoV-2-specific antibody-secreting and memory B-cell generation in patients with acute COVID-19 // *Clinical & Translational Immunology*. 2021. V. 10. № 2.
 18. Cele S., Gazy I., Jackson L., Hwa S.-H., Tegally H., Lustig G., Giandhari J., Pillay S., Wilkinson E., Naidoo Y., Karim F., Ganga Y., Khan K., Bernstein M., Balazs A.B., Gosnell B.I., Hanekom W., Moosa M.-Y.S., Lessells R.J., et al. Escape of SARS-CoV-2 501Y.V2 from neutralization by convalescent plasma // *Nature*. 2021. V. 593. № 7857. P. 142–146.

19. Chang C.-M., Hsu Y.-W., Wong H.S.-C., Wei J.C.-C., Liu X., Liao H.-T., Chang W.-C. Characterization of T-Cell Receptor Repertoire in Patients with Rheumatoid Arthritis Receiving Biologic Therapies // *Disease Markers*. 2019. V. 2019. P. 1–12.
20. Chang C.-M., Feng P., Wu T.-H., Alachkar H., Lee K.-Y., Chang W.-C. Profiling of T Cell Repertoire in SARS-CoV-2-Infected COVID-19 Patients Between Mild Disease and Pneumonia // *Journal of Clinical Immunology*. 2021. V. 41. № 6. P. 1131–1145.
21. Channappanavar R., Fett C., Zhao J., Meyerholz D.K., Perlman S. Virus-Specific Memory CD8 T Cells Provide Substantial Protection from Lethal Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection // *Journal of Virology*. 2014. V. 88. № 19. P. 11034–11044.
22. Chaurasia P., Nguyen T.H.O., Rowntree L.C., Juno J.A., Wheatley A.K., Kent S.J., Kedzierska K., Rossjohn J., Petersen J. Structural basis of biased T cell receptor recognition of an immunodominant HLA-A2 epitope of the SARS-CoV-2 spike protein // *Journal of Biological Chemistry*. 2021. V. 297. № 3. P. 101065.
23. Chen G., Wu D., Guo W., Cao Y., Huang D., Wang H., Wang T., Zhang X., Chen H., Yu H., Zhang X., Zhang M., Wu S., Song J., Chen T., Han M., Li S., Luo X., Zhao J., et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019 // *Journal of Clinical Investigation*. 2020. V. 130. № 5. P. 2620–2629.
24. Chen J., Liu X., Zhang X., Lin Y., Liu D., Xun J., Wang Z., Gu L., Li Q., Yin D., Yang J., Lu H. Decline in neutralising antibody responses, but sustained T-cell immunity, in COVID-19 patients at 7 months post-infection // *Clinical & Translational Immunology*. 2021. V. 10. № 7.
25. Chua R.L., Lukassen S., Trump S., Hennig B.P., Wendisch D., Pott F., Debnath O., Thürmann L., Kurth F., Völker M.T., Kazmierski J., Timmermann B., Twardziok S., Schneider S., Machleidt F., Müller-Redetzky H., Maier M., Krannich A., Schmidt S., et al. COVID-19 severity correlates with airway

- epithelium–immune cell interactions identified by single-cell analysis // *Nature Biotechnology*. 2020. V. 38. № 8. P. 970–979.
26. Dan J.M., Mateus J., Kato Y., Hastie K.M., Yu E.D., Faliti C.E., Grifoni A., Ramirez S.I., Haupt S., Frazier A., Nakao C., Rayaprolu V., Rawlings S.A., Peters B., Krammer F., Simon V., Saphire E.O., Smith D.M., Weiskopf D., et al. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection // *Science* (1979). 2021. V. 371. № 6529.
27. Danilova L., Anagnostou V., Caushi J.X., Sidhom J.-W., Guo H., Chan H.Y., Suri P., Tam A., Zhang J., Asmar M. el, Marrone K.A., Naidoo J., Brahmer J.R., Forde P.M., Baras A.S., Cope L., Velculescu V.E., Pardoll D.M., Housseau F., et al. The Mutation-Associated Neoantigen Functional Expansion of Specific T Cells (MANAFEST) Assay: A Sensitive Platform for Monitoring Antitumor Immunity // *Cancer Immunology Research*. 2018. V. 6. № 8. P. 888–899.
28. Dash P., Fiore-Gartland A.J., Hertz T., Wang G.C., Sharma S., Souquette A., Crawford J.C., Clemens E.B., Nguyen T.H.O., Kedzierska K., Gruta N.L. la, Bradley P., Thomas P.G. Quantifiable predictive features define epitope-specific T cell receptor repertoires // *Nature*. 2017. V. 547. № 7661. P. 89–93.
29. Diao B., Wang C., Tan Y., Chen X., Liu Y., Ning L., Chen L., Li M., Liu Y., Wang G., Yuan Z., Feng Z., Zhang Y., Wu Y., Chen Y. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) // *Frontiers in Immunology*. 2020. V. 11.
30. Ferretti A.P., Kula T., Wang Y., Nguyen D.M.V., Weinheimer A., Dunlap G.S., Xu Q., Nabils N., Perullo C.R., Cristofaro A.W., Whitton H.J., Virbasius A., Olivier K.J., Buckner L.R., Alistar A.T., Whitman E.D., Bertino S.A., Chattopadhyay S., MacBeath G. Unbiased Screens Show CD8+ T Cells of COVID-19 Patients Recognize Shared Epitopes in SARS-CoV-2 that Largely Reside outside the Spike Protein // *Immunity*. 2020. V. 53. № 5. P. 1095–1107.e3.

31. Flacco M.E., Soldato G., Acuti Martellucci C., Martino G. di, Carota R., Caponetti A., Manzoli L. Risk of SARS-CoV-2 Reinfection 18 Months After Primary Infection: Population-Level Observational Study // *Frontiers in Public Health*. 2022. V. 10.
32. Francis J.M., Leistritz-Edwards D., Dunn A., Tarr C., Lehman J., Dempsey C., Hamel A., Rayon V., Liu G., Wang Y., Wille M., Durkin M., Hadley K., Sheena A., Roscoe B., Ng M., Rockwell G., Manto M., Gienger E., et al. Allelic variation in class I HLA determines CD8⁺ T cell repertoire shape and cross-reactive memory responses to SARS-CoV-2 // *Science Immunology*. 2022. V. 7. № 67. P. eabk3070.
33. Gaebler C., Wang Z., Lorenzi J.C.C., Muecksch F., Finkin S., Tokuyama M., Cho A., Jankovic M., Schaefer-Babajew D., Oliveira T.Y., Cipolla M., Viant C., Barnes C.O., Bram Y., Breton G., Hägglöf T., Mendoza P., Hurley A., Turroja M., et al. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2 // *Nature*. 2021. V. 591. № 7851. P. 639–644.
34. Gálvez J., Gálvez J.J., García-Peñarrubia P. Is TCR/pMHC Affinity a Good Estimate of the T-cell Response? An Answer Based on Predictions From 12 Phenotypic Models // *Frontiers in Immunology*. 2019. V. 10.
35. Gangaev A., Ketelaars S.L.C., Isaeva O.I., Patiwaël S., Dopler A., Hoefakker K., Biasi S. de, Gibellini L., Mussini C., Guaraldi G., Girardis M., Ormeno C.M.P.T., Hekking P.J.M., Lardy N.M., Toebes M., Balderas R., Schumacher T.N., Ovaas H., Cossarizza A., et al. Identification and characterization of a SARS-CoV-2 specific CD8⁺ T cell response with immunodominant features // *Nature Communications*. 2021. V. 12. № 1. P. 2593.
36. Gao Y., Cai C., Grifoni A., Müller T.R., Niessl J., Olofsson A., Humbert M., Hansson L., Österborg A., Bergman P., Chen P., Olsson A., Sandberg J.K., Weiskopf D., Price D.A., Ljunggren H.-G., Karlsson A.C., Sette A., Aleman S., et al. Ancestral SARS-CoV-2-specific T cells cross-recognize the Omicron variant // *Nature Medicine*. 2022. V. 28. № 3. P. 472–476.

37. Garboczi D.N., Hung D.T., Wiley D.C. HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1992. V. 89. № 8. P. 3429–3433.
38. Gaunt E.R., Hardie A., Claas E.C.J., Simmonds P., Templeton K.E. Epidemiology and Clinical Presentations of the Four Human Coronaviruses 229E, HKU1, NL63, and OC43 Detected over 3 Years Using a Novel Multiplex Real-Time PCR Method // *Journal of Clinical Microbiology*. 2010. V. 48. № 8. P. 2940–2947.
39. Geers D., Shamier M.C., Bogers S., Hartog G. den, Gommers L., Nieuwkoop N.N., Schmitz K.S., Rijsbergen L.C., Osch J.A.T. van, Dijkhuizen E., Smits G., Comvalius A., Mourik D. van, Caniels T.G., Gils M.J. van, Sanders R.W., Oude Munnink B.B., Molenkamp R., Jager H.J. de, et al. SARS-CoV-2 variants of concern partially escape humoral but not T cell responses in COVID-19 convalescent donors and vaccine recipients // *Science Immunology*. 2021. V. 6. № 59.
40. GeurtsvanKessel C.H., Geers D., Schmitz K.S., Mykytyn A.Z., Lamers M.M., Bogers S., Scherbeijn S., Gommers L., Sablerolles R.S.G., Nieuwkoop N.N., Rijsbergen L.C., Dijk L.L.A. van, Wilde J. de, Alblas K., Breugem T.I., Rijnders B.J.A., Jager H. de, Weiskopf D., Kuy P.H.M. van der, et al. Divergent SARS-CoV-2 Omicron–reactive T and B cell responses in COVID-19 vaccine recipients // *Science Immunology*. 2022. V. 7. № 69.
41. Giamarellos-Bourboulis E.J., Netea M.G., Rovina N., Akinosoglou K., Antoniadou A., Antonakos N., Damoraki G., Gkavogianni T., Adami M.-E., Katsaounou P., Ntaganou M., Kyriakopoulou M., Dimopoulos G., Koutsodimitropoulos I., Velissaris D., Koufargyris P., Karageorgos A., Katrini K., Lekakis V., et al. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure // *Cell Host & Microbe*. 2020. V. 27. № 6. P. 992- 1000.e3.

42. Gil A., Yassai M.B., Naumov Y.N., Selin L.K. Narrowing of Human Influenza A Virus-Specific T Cell Receptor α and β Repertoires with Increasing Age // *Journal of Virology*. 2015. V. 89. № 8. P. 4102–4116.
43. Glanville J., Huang H., Nau A., Hatton O., Wagar L.E., Rubelt F., Ji X., Han A., Krams S.M., Pettus C., Haas N., Arlehamn C.S.L., Sette A., Boyd S.D., Scriba T.J., Martinez O.M., Davis M.M. Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire // *Nature*. 2017. V. 547. № 7661. P. 94–98.
44. Goel R.R., Painter M.M., Apostolidis S.A., Mathew D., Meng W., Rosenfeld A.M., Lundgreen K.A., Reynaldi A., Khoury D.S., Pattekar A., Gouma S., Kuri-Cervantes L., Hicks P., Dysinger S., Hicks A., Sharma H., Herring S., Korte S., Baxter A.E., et al. mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern // *Science (1979)*. 2021. V. 374. № 6572.
45. Gombar S., Bergquist T., Pejaver V., Hammarlund N.E., Murugesan K., Mooney S., Shah N., Pinsky B.A., Banaei N. SARS-CoV-2 infection and COVID-19 severity in individuals with prior seasonal coronavirus infection // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2021. V. 100. № 2. P. 115338.
46. Grasselli G., Zangrillo A., Zanella A., Antonelli M., Cabrini L., Castelli A., Cereda D., Coluccello A., Foti G., Fumagalli R., Iotti G., Latronico N., Lorini L., Merler S., Natalini G., Piatti A., Ranieri M.V., Scandroglio A.M., Storti E., et al. Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy. // *JAMA*. 2020. V. 323. № 16. P. 1574–1581.
47. Greiff V., Miho E., Menzel U., Reddy S.T. Bioinformatic and Statistical Analysis of Adaptive Immune Repertoires // *Trends in Immunology*. 2015. V. 36. № 11. P. 738–749.
48. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., Rawlings S.A., Sutherland A., Premkumar L., Jadi R.S., Marrama D., Silva A.M. de, Frazier A., Carlin A.F., Greenbaum J.A., Peters B., Krammer F., Smith D.M., Crotty S., et al. Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2

- Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals // Cell. 2020. V. 181. № 7. P. 1489- 1501.e15.
49. Gudbjartsson D.F., Norddahl G.L., Melsted P., Gunnarsdottir K., Holm H., Eythorsson E., Arnthorsson A.O., Helgason D., Bjarnadottir K., Ingvarsson R.F., Thorsteinsdottir B., Kristjansdottir S., Birgisdottir K., Kristinsdottir A.M., Sigurdsson M.I., Arnadottir G.A., Ivarsdottir E. v., Andresdottir M., Jonsson F., et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland // New England Journal of Medicine. 2020. V. 383. № 18. P. 1724–1734.
 50. Guo L., Wang G., Wang Y., Zhang Q., Ren L., Gu X., Huang T., Zhong J., Wang Y., Wang X., Huang L., Xu L., Wang C., Chen L., Xiao X., Peng Y., Knight J.C., Dong T., Cao B., et al. SARS-CoV-2-specific antibody and T-cell responses 1 year after infection in people recovered from COVID-19: a longitudinal cohort study // The Lancet Microbe. 2022. V. 3. № 5. P. e348–e356.
 51. Habel J.R., Nguyen T.H.O., Sandt C.E. van de, Juno J.A., Chaurasia P., Wragg K., Koutsakos M., Hensen L., Jia X., Chua B., Zhang W., Tan H.-X., Flanagan K.L., Doolan D.L., Torresi J., Chen W., Wakim L.M., Cheng A.C., Doherty P.C., et al. Suboptimal SARS-CoV-2-specific CD8⁺ T cell response associated with the prominent HLA-A*02:01 phenotype // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2020. V. 117. № 39. P. 24384–24391.
 52. Harrison A.G., Lin T., Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis // Trends in Immunology. 2020. V. 41. № 12. P. 1100–1115.
 53. Hughes R., Whitley L., Fitovski K., Schneble H.-M., Muros E., Sauter A., Craveiro L., Dillon P., Bonati U., Jessop N., Pedotti R., Koendgen H. COVID-19 in ocrelizumab-treated people with multiple sclerosis // Multiple Sclerosis and Related Disorders. 2021. V. 49. P. 102725.
 54. Jackson C.B., Farzan M., Chen B., Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells // Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2022. V. 23. № 1. P. 3–20.

55. Jones J., Faruqi A., Sullivan J., Calabrese C., Calabrese L. COVID-19 Outcomes in Patients Undergoing B Cell Depletion Therapy and Those with Humoral Immunodeficiency States: A Scoping Review // *Pathogens and Immunity*. 2021. V. 6. № 1. P. 76–103.
56. Jung J.H., Rha M.-S., Sa M., Choi H.K., Jeon J.H., Seok H., Park D.W., Park S.-H., Jeong H.W., Choi W.S., Shin E.-C. SARS-CoV-2-specific T cell memory is sustained in COVID-19 convalescent patients for 10 months with successful development of stem cell-like memory T cells // *Nature Communications*. 2021. V. 12. № 1. P. 4043.
57. Kang C.K., Kim M., Lee S., Kim G., Choe P.G., Park W.B., Kim N.J., Lee C.-H., Kim I.S., Jung K., Lee D.-S., Shin H.M., Kim H.-R., Oh M. Longitudinal Analysis of Human Memory T-Cell Response According to the Severity of Illness up to 8 Months After Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection // *The Journal of Infectious Diseases*. 2021. V. 224. № 1. P. 39–48.
58. Kared H., Redd A.D., Bloch E.M., Bonny T.S., Sumatoh H., Kairi F., Carbajo D., Abel B., Newell E.W., Bettinotti M.P., Benner S.E., Patel E.U., Littlefield K., Laeyendecker O., Shoham S., Sullivan D., Casadevall A., Pekosz A., Nardin A., et al. SARS-CoV-2-specific CD8+ T cell responses in convalescent COVID-19 individuals // *Journal of Clinical Investigation*. 2021. V. 131. № 5.
59. Keeton R., Richardson S.I., Moyo-Gwete T., Hermanus T., Tincho M.B., Benede N., Manamela N.P., Baguma R., Makhado Z., Ngomti A., Motlou T., Mennen M., Chinhoyi L., Skelem S., Maboreke H., Doolabh D., Iranzadeh A., Otter A.D., Brooks T., et al. Prior infection with SARS-CoV-2 boosts and broadens Ad26.COV2.S immunogenicity in a variant-dependent manner // *Cell Host & Microbe*. 2021. V. 29. № 11. P. 1611- 1619.e5.
60. Keeton R., Tincho M.B., Ngomti A., Baguma R., Benede N., Suzuki A., Khan K., Cele S., Bernstein M., Karim F., Madzorera S. v., Moyo-Gwete T., Mennen M., Skelem S., Adriaanse M., Mutithu D., Aremu O., Stek C., Bruyn E. du, et al. T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron // *Nature*. 2022. V. 603. № 7901. P. 488–492.

61. Kim Y.M., Shin E.C. Type I and III interferon responses in SARS-CoV-2 infection // *Exp Mol Med*. 2021. V. 53. № 5. P. 750–760.
62. Klein S.L., Pekosz A., Park H.-S., Ursin R.L., Shapiro J.R., Benner S.E., Littlefield K., Kumar S., Naik H.M., Betenbaugh M.J., Shrestha R., Wu A.A., Hughes R.M., Burgess I., Caturegli P., Laeyendecker O., Quinn T.C., Sullivan D., Shoham S., et al. Sex, age, and hospitalization drive antibody responses in a COVID-19 convalescent plasma donor population // *Journal of Clinical Investigation*. 2020. V. 130. № 11. P. 6141–6150.
63. Kobayashi T., Yoshii K., Linton N.M., Suzuki M., Nishiura H. Age dependence of the natural history of infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): an analysis of Diamond Princess data // *International Journal of Infectious Diseases*. 2022. V. 115. P. 109–115.
64. Koutsakos M., Rowntree L.C., Hensen L., Chua B.Y., Sandt C.E. van de, Habel J.R., Zhang W., Jia X., Kedzierski L., Ashhurst T.M., Putri G.H., Marsh-Wakefield F., Read M.N., Edwards D.N., Clemens E.B., Wong C.Y., Mordant F.L., Juno J.A., Amanat F., et al. Integrated immune dynamics define correlates of COVID-19 severity and antibody responses // *Cell Reports Medicine*. 2021. V. 2. № 3. P. 100208.
65. Krummey S.M., Morris A.B., Jacobs J.R., McGuire D.J., Ando S., Tong K.P., Zhang W., Robertson J., Guasch S.A., Araki K., Larsen C.P., Evavold B.D., Kissick H.T., Ford M.L. CD45RB Status of CD8+ T Cell Memory Defines T Cell Receptor Affinity and Persistence // *Cell Reports*. 2020. V. 30. № 5. P. 1282- 1291.e5.
66. Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., Meng W., Rosenfeld A.M., Ittner C.A.G., Weisman A.R., Agyekum R.S., Mathew D., Baxter A.E., Vella L.A., Kuthuru O., Apostolidis S.A., Bershaw L., Dougherty J., Greenplate A.R., Pattekar A., Kim J., Han N., Gouma S., et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19 // *Science Immunology*. 2020. V. 5. № 49.

67. Ladner J.T., Henson S.N., Boyle A.S., Engelbrekton A.L., Fink Z.W., Rahee F., D'ambrozio J., Schaecher K.E., Stone M., Dong W., Dadwal S., Yu J., Caligiuri M.A., Cieplak P., Bjørås M., Fenstad M.H., Nordbø S.A., Kainov D.E., Muranaka N., et al. Epitope-resolved profiling of the SARS-CoV-2 antibody response identifies cross-reactivity with endemic human coronaviruses // *Cell Reports Medicine*. 2021. V. 2. № 1. P. 100189.
68. Laing A.G., Lorenc A., Molino Del Barrio I. del, Das A., Fish M., Monin L., Muñoz-Ruiz M., McKenzie D.R., Hayday T.S., Francos-Quijorna I., Kamdar S., Joseph M., Davies D., Davis R., Jennings A., Zlatareva I., Vantourout P., Wu Y., Sofra V., et al. A consensus Covid-19 immune signature combines immuno-protection with discrete sepsis-like traits associated with poor prognosis // *medRxiv*. 2020. P. 2020.06.08.20125112.
69. Li M.-Y., Li L., Zhang Y., Wang X.-S. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues // *Infectious Diseases of Poverty*. 2020. V. 9. № 1. P. 45.
70. Liao M., Liu Y., Yuan J., Wen Y., Xu G., Zhao J., Cheng L., Li J., Wang X., Wang F., Liu L., Amit I., Zhang S., Zhang Z. Single-cell landscape of bronchoalveolar immune cells in patients with COVID-19 // *Nature Medicine*. 2020. V. 26. № 6. P. 842–844.
71. Logan R., Fleischmann Z., Annis S., Wehe A.W., Tilly J.L., Woods D.C., Khrapko K. 3GOLD: optimized Levenshtein distance for clustering third-generation sequencing data // *BMC Bioinformatics*. 2022. V. 23. № 1. P. 95.
72. Long Q.-X., Tang X.-J., Shi Q.-L., Li Q., Deng H.-J., Yuan J., Hu J.-L., Xu W., Zhang Y., Lv F.-J., Su K., Zhang F., Gong J., Wu B., Liu X.-M., Li J.-J., Qiu J.-F., Chen J., Huang A.-L. Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections // *Nature Medicine*. 2020. V. 26. № 8. P. 1200–1204.
73. Loyal L., Braun J., Henze L., Kruse B., Dingeldey M., Reimer U., Kern F., Schwarz T., Mangold M., Unger C., Dörfler F., Kadler S., Rosowski J., Gürcan K., Uyar-Aydin Z., Frentsch M., Kurth F., Schnatbaum K., Eckey M., et al.

- Cross-reactive CD4⁺ T cells enhance SARS-CoV-2 immune responses upon infection and vaccination // *Science* (1979). 2021. V. 374. № 6564.
74. Lu X., Hosono Y., Nagae M., Ishizuka S., Ishikawa E., Motooka D., Ozaki Y., Sax N., Maeda Y., Kato Y., Morita T., Shinnakasu R., Inoue T., Onodera T., Matsumura T., Shinkai M., Sato T., Nakamura S., Mori S., et al. Identification of conserved SARS-CoV-2 spike epitopes that expand public cTfh clonotypes in mild COVID-19 patients // *Journal of Experimental Medicine*. 2021. V. 218. № 12.
75. Lukassen S., Chua R.L., Trefzer T., Kahn N.C., Schneider M.A., Muley T., Winter H., Meister M., Veith C., Boots A.W., Hennig B.P., Kreuter M., Conrad C., Eils R. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells // *EMBO J*. 2020. V. 39. № 10.
76. Lv H., Wu N.C., Tsang O.T.-Y., Yuan M., Perera R.A.P.M., Leung W.S., So R.T.Y., Chan J.M.C., Yip G.K., Chik T.S.H., Wang Y., Choi C.Y.C., Lin Y., Ng W.W., Zhao J., Poon L.L.M., Peiris J.S.M., Wilson I.A., Mok C.K.P. Cross-reactive Antibody Response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV Infections // *Cell Reports*. 2020. V. 31. № 9. P. 107725.
77. Marcotte H., Piralla A., Zuo F., Du L., Cassaniti I., Wan H., Kumagai-Braesh M., Andréll J., Percivalle E., Sammartino J.C., Wang Y., Vlachioteis S., Attevall J., Bergami F., Ferrari A., Colaneri M., Vecchia M., Sambo M., Zuccaro V., et al. Immunity to SARS-CoV-2 up to 15 months after infection // *iScience*. 2022. V. 25. № 2. P. 103743.
78. Mateus J., Grifoni A., Tarke A., Sidney J., Ramirez S.I., Dan J.M., Burger Z.C., Rawlings S.A., Smith D.M., Phillips E., Mallal S., Lammers M., Rubiro P., Quiambao L., Sutherland A., Yu E.D., Silva Antunes R. da, Greenbaum J., Frazier A., et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans // *Science* (1979). 2020. V. 370. № 6512. P. 89–94.
79. Mathew D., Giles J.R., Baxter A.E., Oldridge D.A., Greenplate A.R., Wu J.E., Alanio C., Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., D'Andrea K., Manne S., Chen Z., Huang Y.J., Reilly J.P., Weisman A.R., Ittner C.A.G., Kuthuru O.,

- Dougherty J., Nzingha K., et al. Deep immune profiling of COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications // *Science* (1979). 2020. V. 369. № 6508.
80. Mazzone A., Salvati L., Maggi L., Capone M., Vanni A., Spinicci M., Mencarini J., Caporale R., Peruzzi B., Antonelli A., Trotta M., Zammarchi L., Ciani L., Gori L., Lazzeri C., Matucci A., Vultaggio A., Rossi O., Almerigogna F., et al. Impaired immune cell cytotoxicity in severe COVID-19 is IL-6 dependent // *Journal of Clinical Investigation*. 2020. V. 130. № 9. P. 4694–4703.
81. McClain M.T., Park L.P., Nicholson B., Veldman T., Zaas A.K., Turner R., Lambkin-Williams R., Gilbert A.S., Ginsburg G.S., Woods C.W. Longitudinal analysis of leukocyte differentials in peripheral blood of patients with acute respiratory viral infections // *Journal of Clinical Virology*. 2013. V. 58. № 4. P. 689–695.
82. McMahan K., Yu J., Mercado N.B., Loos C., Tostanoski L.H., Chandrashekar A., Liu J., Peter L., Atyeo C., Zhu A., Bondzie E.A., Dagotto G., Gebre M.S., Jacob-Dolan C., Li Z., Nampanya F., Patel S., Pessaint L., Ry A. van, et al. Correlates of protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques // *Nature*. 2021. V. 590. № 7847. P. 630–634.
83. Miconnet I., Marrau A., Farina A., Taffé P., Vigano S., Harari A., Pantaleo G. Large TCR Diversity of Virus-Specific CD8 T Cells Provides the Mechanistic Basis for Massive TCR Renewal after Antigen Exposure // *The Journal of Immunology*. 2011. V. 186. № 12. P. 7039–7049.
84. Miller J.D., Most R.G. van der, Akondy R.S., Glidewell J.T., Albott S., Masopust D., Murali-Krishna K., Mahar P.L., Edupuganti S., Lalor S., Germon S., Rio C. del, Mulligan M.J., Staprans S.I., Altman J.D., Feinberg M.B., Ahmed R. Human Effector and Memory CD8+ T Cell Responses to Smallpox and Yellow Fever Vaccines // *Immunity*. 2008. V. 28. № 5. P. 710–722.
85. Minervina A.A., Pogorelyy M. v., Kirk A.M., Crawford J.C., Allen E.K., Chou C.-H., Mettelman R.C., Allison K.J., Lin C.-Y., Brice D.C., Zhu X., Vegesana K., Wu G., Trivedi S., Kottapalli P., Darnell D., McNeely S., Olsen S.R.,

- Schultz-Cherry S., et al. SARS-CoV-2 antigen exposure history shapes phenotypes and specificity of memory CD8⁺ T cells // *Nature Immunology*. 2022. V. 23. № 5. P. 781–790.
86. 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., Dolzhikova I. v., Filimonova I.N., Gracheva A.N., Ivanova O.I., Kizilova A., Komogorova V. v., Komova A., 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 Infectious Diseases*. 2022.
87. Moriyama M., Hugentobler W.J., Iwasaki A. Seasonality of Respiratory Viral Infections // *Annual Review of Virology*. 2020. V. 7. № 1. P. 83–101.
88. Naranbhai V., Nathan A., Kaseke C., Berrios C., Khatri A., Choi S., Getz M.A., Tano-Menka R., Ofoman O., Gayton A., Senjobe F., Zhao Z., St Denis K.J., Lam E.C., Carrington M., Garcia-Beltran W.F., Balazs A.B., Walker B.D., Iafrate A.J., et al. T cell reactivity to the SARS-CoV-2 Omicron variant is preserved in most but not all individuals // *Cell*. 2022. V. 185. № 6. P. 1041-1051.e6.
89. Nayak K., Gottimukkala K., Kumar S., Reddy E.S., Edara V.V., Kauffman R., Floyd K., Mantus G., Savargaonkar D., Goel P.K., Arora S., Rahi M., Davis C.W., Linderman S., Wrammert J., Suthar M.S., Ahmed R., Sharma A., Murali-Krishna K., et al. Characterization of neutralizing versus binding antibodies and memory B cells in COVID-19 recovered individuals from India // *Virology*. 2021. V. 558. P. 13–21.
90. Neher R.A., Dyrdak R., Druelle V., Hodcroft E.B., Albert J. Potential impact of seasonal forcing on a SARS-CoV-2 pandemic // *Swiss Medical Weekly*. 2020.
91. Neidleman J., Luo X., Frouard J., Xie G., Gill G., Stein E.S., McGregor M., Ma T., George A.F., Kusters A., Greene W.C., Vasquez J., Ghosn E., Lee S., Roan N.R. SARS-CoV-2-Specific T Cells Exhibit Phenotypic Features of Helper

- Function, Lack of Terminal Differentiation, and High Proliferation Potential // Cell Reports Medicine. 2020. V. 1. № 6. P. 100081.
92. Nelde A., Bilich T., Heitmann J.S., Maringer Y., Salih H.R., Roerden M., Lübke M., Bauer J., Rieth J., Wacker M., Peter A., Hörber S., Traenkle B., Kaiser P.D., Rothbauer U., Becker M., Junker D., Krause G., Strengert M., et al. SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition // Nature Immunology. 2021. V. 22. № 1. P. 74–85.
93. Nersisyan S., Zhiyanov A., Shkurnikov M., Tonevitsky A. T-CoV: a comprehensive portal of HLA-peptide interactions affected by SARS-CoV-2 mutations // Nucleic Acids Research. 2022. V. 50. № D1. P. D883–D887.
94. Ng K.W., Faulkner N., Cornish G.H., Rosa A., Harvey R., Hussain S., Ulferts R., Earl C., Wrobel A.G., Benton D.J., Roustan C., Bolland W., Thompson R., Agua-Doce A., Hobson P., Heaney J., Rickman H., Paraskevopoulou S., Houlihan C.F., et al. Preexisting and de novo humoral immunity to SARS-CoV-2 in humans // Science (1979). 2020. V. 370. № 6522. P. 1339–1343.
95. Nguyen T.H.O., Sant S., Bird N.L., Grant E.J., Clemens E.B., Koutsakos M., Valkenburg S.A., Gras S., Lappas M., Jaworowski A., Crowe J., Loh L., Kedzierska K. Perturbed CD8⁺ T cell immunity across universal influenza epitopes in the elderly. // J Leukoc Biol. 2018. V. 103. № 2. P. 321–339.
96. Nguyen T.H.O., Rowntree L.C., Petersen J., Chua B.Y., Hensen L., Kedzierski L., Sandt C.E. van de, Chaurasia P., Tan H.-X., Habel J.R., Zhang W., Allen L.F., Earnest L., Mak K.Y., Juno J.A., Wragg K., Mordant F.L., Amanat F., Krammer F., et al. CD8⁺ T cells specific for an immunodominant SARS-CoV-2 nucleocapsid epitope display high naive precursor frequency and TCR promiscuity // Immunity. 2021. V. 54. № 5. P. 1066- 1082.e5.
97. Notarbartolo S., Ranzani V., Bandera A., Gruarin P., Bevilacqua V., Putignano A.R., Gobbini A., Galeota E., Manara C., Bombaci M., Pesce E., Zagato E., Favalli A., Sarnicola M.L., Curti S., Crosti M., Martinovic M., Fabbris T., Marini F., et al. Integrated longitudinal immunophenotypic, transcriptional, and

- repertoire analyses delineate immune responses in patients with COVID-19 // *Science Immunology*. 2021. V. 6. № 62.
98. Oberhardt V., Luxenburger H., Kemming J., Schulien I., Ciminski K., Giese S., Csernalabics B., Lang-Meli J., Janowska I., Staniek J., Wild K., Basho K., Marinescu M.S., Fuchs J., Topfstedt F., Janda A., Sogukpinar O., Hilger H., Stete K., et al. Rapid and stable mobilization of CD8⁺ T cells by SARS-CoV-2 mRNA vaccine // *Nature*. 2021. V. 597. № 7875. P. 268–273.
 99. O’Driscoll M., Ribeiro Dos Santos G., Wang L., Cummings D.A.T., Azman A.S., Paireau J., Fontanet A., Cauchemez S., Salje H. Age-specific mortality and immunity patterns of SARS-CoV-2 // *Nature*. 2021. V. 590. № 7844. P. 140–145.
 100. Park J.J., Lee K.A. v, Lam S.Z., Chen S. T cell receptor repertoire signatures associated with COVID-19 severity // *bioRxiv*. 2021. P. 2021.11.30.470640.
 101. Patel N.J., D’Silva K.M., Hsu T.Y., DiIorio M., Fu X., Cook C., Prisco L., Martin L., Vanni K.M.M., Zaccardelli A., Zhang Y., Sparks J.A., Wallace Z.S. Coronavirus Disease 2019 Outcomes Among Recipients of Anti-CD20 Monoclonal Antibodies for Immune-Mediated Diseases: A Comparative Cohort Study // *ACR Open Rheumatology*. 2022. V. 4. № 3. P. 238–246.
 102. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G., Yao X., Yin Z., Dong D., Dejnirattisai W., Rostron T., Supasa P., Liu C., López-Camacho C., Slon-Campos J., Zhao Y., Stuart D.I., Paesen G.C., Grimes J.M., Antson A.A., Bayfield O.W., Hawkins D.E.D.P., et al. Broad and strong memory CD4⁺ and CD8⁺ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19 // *Nature Immunology*. 2020. V. 21. № 11. P. 1336–1345.
 103. Peng Y., Felce S.L., Dong D., Penkava F., Mentzer A.J., Yao X., Liu G., Yin Z., Chen J.-L., Lu Y., Wellington D., Wing P.A.C., Dominey-Foy D.C.C., Jin C., Wang W., Hamid M.A., Fernandes R.A., Wang B., Fries A., et al. An immunodominant NP105–113-B*07:02 cytotoxic T cell response controls viral

- replication and is associated with less severe COVID-19 disease // *Nature Immunology*. 2022. V. 23. № 1. P. 50–61.
104. Pogorelyy M. v., Fedorova A.D., McLaren J.E., Ladell K., Bagaev D. v., Eliseev A. v., Mikelov A.I., Koneva A.E., Zvyagin I. v., Price D.A., Chudakov D.M., Shugay M. Exploring the pre-immune landscape of antigen-specific T cells // *Genome Medicine*. 2018. V. 10. № 1. P. 68.
105. Price D.A., Brenchley J.M., Ruff L.E., Betts M.R., Hill B.J., Roederer M., Koup R.A., Migueles S.A., Gostick E., Wooldridge L., Sewell A.K., Connors M., Douek D.C. Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8⁺ T cell populations specific for persistent DNA viruses // *Journal of Experimental Medicine*. 2005. V. 202. № 10. P. 1349–1361.
106. Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y., Xie C., Ma K., Shang K., Wang W., Tian D.-S. Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China // *Clinical Infectious Diseases*. 2020. V. 71. № 15. P. 762–768.
107. Ren L., Zhang L., Chang D., Wang J., Hu Y., Chen H., Guo L., Wu C., Wang C., Wang Y., Wang Y., Wang G., Yang S., Cruz C.S. dela, Sharma L., Wang L., Zhang D., Wang J. The kinetics of humoral response and its relationship with the disease severity in COVID-19 // *Communications Biology*. 2020. V. 3. № 1. P. 780.
108. Renner K., Schwittay T., Chaabane S., Gottschling J., Müller C., Tiefenböck C., Salewski J.-N., Winter F., Buchtler S., Balam S., Malfertheiner M. v., Lubnow M., Lunz D., Graf B., Hitzenbichler F., Hanses F., Poeck H., Kreutz M., Orsó E., et al. Severe T cell hyporeactivity in ventilated COVID-19 patients correlates with prolonged virus persistence and poor outcomes // *Nature Communications*. 2021. V. 12. № 1. P. 3006.
109. Reuben A., Zhang J., Chiou S.-H., Gittelman R.M., Li J., Lee W.-C., Fujimoto J., Behrens C., Liu X., Wang F., Quek K., Wang C., Kheradmand F., Chen R., Chow C.-W., Lin H., Bernatchez C., Jalali A., Hu X., et al.

- Comprehensive T cell repertoire characterization of non-small cell lung cancer
// Nature Communications. 2020. V. 11. № 1. P. 603.
110. Reynisson B., Alvarez B., Paul S., Peters B., Nielsen M. NetMHCpan-4.1 and NetMHCIIpan-4.0: improved predictions of MHC antigen presentation by concurrent motif deconvolution and integration of MS MHC eluted ligand data // Nucleic Acids Research. 2020. V. 48. № W1. P. W449–W454.
111. Rickinson A.B., Long H.M., Palendira U., Münz C., Hislop A.D. Cellular immune controls over Epstein–Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory // Trends in Immunology. 2014. V. 35. № 4. P. 159–169.
112. Riou C., Keeton R., Moyo-Gwete T., Hermanus T., Kgagudi P., Baguma R., Valley-Omar Z., Smith M., Tegally H., Doolabh D., Iranzadeh A., Tyers L., Mutavhatsindi H., Tincho M.B., Benede N., Marais G., Chinhoyi L.R., Mennen M., Skelem S., et al. Escape from recognition of SARS-CoV-2 variant spike epitopes but overall preservation of T cell immunity // Science Translational Medicine. 2022. V. 14. № 631.
113. Rodda L.B., Netland J., Shehata L., Pruner K.B., Morawski P.A., Thouvenel C.D., Takehara K.K., Eggenberger J., Hemann E.A., Waterman H.R., Fahning M.L., Chen Y., Hale M., Rathe J., Stokes C., Wrenn S., Fiala B., Carter L., Hamerman J.A., et al. Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19 // Cell. 2021. V. 184. № 1. P. 169-183.e17.
114. Rydyznski Moderbacher C., Ramirez S.I., Dan J.M., Grifoni A., Hastie K.M., Weiskopf D., Belanger S., Abbott R.K., Kim C., Choi J., Kato Y., Crotty E.G., Kim C., Rawlings S.A., Mateus J., Tse L.P.V., Frazier A., Baric R., Peters B., et al. Antigen-Specific Adaptive Immunity to SARS-CoV-2 in Acute COVID-19 and Associations with Age and Disease Severity // Cell. 2020. V. 183. № 4. P. 996- 1012.e19.
115. Sagar M., Reifler K., Rossi M., Miller N.S., Sinha P., White L.F., Mizgerd J.P. Recent endemic coronavirus infection is associated with less-severe COVID-19 // Journal of Clinical Investigation. 2021. V. 131. № 1.

116. Saini S.K., Hersby D.S., Tamhane T., Povlsen H.R., Hernandez S.P.A., Nielsen M., Gang A.O., Hadrup S.R. SARS-CoV-2 genome-wide T cell epitope mapping reveals immunodominance and substantial CD8⁺ T cell activation in COVID-19 patients // *Science Immunology*. 2021. V. 6. № 58.
117. Salomé B., Horowitz A. Impaired CD4 T-cell Response to SARS-CoV-2: Rationale for PD-1 Blockade in Patients with Cancer and COVID-19? // *Cancer Discovery*. 2021. V. 11. № 8. P. 1877–1878.
118. Schulien I., Kemming J., Oberhardt V., Wild K., Seidel L.M., Killmer S., Sagar, Daul F., Salvat Lago M., Decker A., Luxenburger H., Binder B., Bettinger D., Sogukpinar O., Rieg S., Panning M., Huzly D., Schwemmle M., Kochs G., et al. Characterization of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8⁺ T cells // *Nature Medicine*. 2021. V. 27. № 1. P. 78–85.
119. Schwarzkopf S., Krawczyk A., Knop D., Klump H., Heinold A., Heinemann F.M., Thümmel L., Temme C., Breyer M., Witzke O., Dittmer U., Lenz V., Horn P.A., Lindemann M. Cellular Immunity in COVID-19 Convalescents with PCR-Confirmed Infection but with Undetectable SARS-CoV-2-Specific IgG // *Emerging Infectious Diseases*. 2021. V. 27. № 1. P. 122–129.
120. Sethna Z., Elhanati Y., Callan C.G., Walczak A.M., Mora T. OLGA: fast computation of generation probabilities of B- and T-cell receptor amino acid sequences and motifs // *Bioinformatics*. 2019. V. 35. № 17. P. 2974–2981.
121. Shah V.K., Firmal P., Alam A., Ganguly D., Chattopadhyay S. Overview of Immune Response During SARS-CoV-2 Infection: Lessons From the Past // *Frontiers in Immunology*. 2020. V. 11.
122. Sharon E., Sibener L. v, Battle A., Fraser H.B., Garcia K.C., Pritchard J.K. Genetic variation in MHC proteins is associated with T cell receptor expression biases // *Nature Genetics*. 2016. V. 48. № 9. P. 995–1002.
123. Sherina N., Piralla A., Du L., Wan H., Kumagai-Braesch M., Andréll J., Braesch-Andersen S., Cassaniti I., Percivalle E., Sarasini A., Bergami F., Martino R. di, Colaneri M., Vecchia M., Sambo M., Zuccaro V., Bruno R.,

- Sachs M., Oggionni T., et al. Persistence of SARS-CoV-2-specific B and T cell responses in convalescent COVID-19 patients 6–8 months after the infection // *Med.* 2021. V. 2. № 3. P. 281- 295.e4.
124. 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.
125. Shugay M., Bagaev D. v, Zvyagin I. v, Vroomans R.M., Crawford J.C., Dolton G., Komech E.A., Sycheva A.L., Koneva A.E., Egorov E.S., Eliseev A. v, Van Dyk E., Dash P., Attaf M., Rius C., Ladell K., McLaren J.E., Matthews K.K., Clemens E.B., et al. VDJdb: a curated database of T-cell receptor sequences with known antigen specificity // *Nucleic Acids Research.* 2018. V. 46. № D1. P. D419–D427.
126. Silva Antunes R. da, Pallikkuth S., Williams E., Dawen Yu E., Mateus J., Quiambao L., Wang E., Rawlings S.A., Stadlbauer D., Jiang K., Amanat F., Arnold D., Andrews D., Fuego I., Dan J.M., Grifoni A., Weiskopf D., Krammer F., Crotty S., et al. Differential T-Cell Reactivity to Endemic Coronaviruses and SARS-CoV-2 in Community and Health Care Workers // *The Journal of Infectious Diseases.* 2021. V. 224. № 1. P. 70–80.
127. Simnica D., Schultheiß C., Mohme M., Paschold L., Willscher E., Fitzek A., Püschel K., Matschke J., Ciesek S., Sedding D.G., Zhao Y., Gagliani N., Maringer Y., Walz J.S., Heide J., Schulze-zur-Wiesch J., Binder M. Landscape of T-cell repertoires with public COVID-19-associated T-cell receptors in pre-pandemic risk cohorts // *Clinical & Translational Immunology.* 2021. V. 10. № 9.
128. Snyder T.M., Gittelman R.M., Klinger M., May D.H., Osborne E.J., Taniguchi R., Zahid H.J., Kaplan I.M., Dines J.N., Noakes M.T., Pandya R., Chen X., Elasady S., Svejnoha E., Ebert P., Pesesky M.W., Almeida P. de,

- O'Donnell H., DeGottardi Q., et al. Magnitude and Dynamics of the T-Cell Response to SARS-CoV-2 Infection at Both Individual and Population Levels // medRxiv. 2020. P. 2020.07.31.20165647.
129. Sokal A., Chappert P., Barba-Spaeth G., Roeser A., Fourati S., Azzaoui I., Vandenberghe A., Fernandez I., Meola A., Bouvier-Alias M., Crickx E., Beldi-Ferchiou A., Hue S., Languille L., Michel M., Baloul S., Noizat-Pirenne F., Luka M., Mégret J., et al. Maturation and persistence of the anti-SARS-CoV-2 memory B cell response // *Cell*. 2021. V. 184. № 5. P. 1201- 1213.e14.
130. Su S., Wong G., Shi W., Liu J., Lai A.C.K., Zhou J., Liu W., Bi Y., Gao G.F. Epidemiology, Genetic Recombination, and Pathogenesis of Coronaviruses // *Trends in Microbiology*. 2016. V. 24. № 6. P. 490–502.
131. Sun K., Gu L., Ma L., Duan Y. Atlas of ACE2 gene expression reveals novel insights into transmission of SARS-CoV-2 // *Heliyon*. 2021. V. 7. № 1. P. e05850.
132. Swadling L., Diniz M.O., Schmidt N.M., Amin O.E., Chandran A., Shaw E., Pade C., Gibbons J.M., Bert N. le, Tan A.T., Jeffery-Smith A., Tan C.C.S., Tham C.Y.L., Kucykowicz S., Aidoo-Micah G., Rosenheim J., Davies J., Johnson M., Jensen M.P., et al. Pre-existing polymerase-specific T cells expand in abortive seronegative SARS-CoV-2 // *Nature*. 2022. V. 601. № 7891. P. 110–117.
133. Tan C.C.S., Owen C.J., Tham C.Y.L., Bertoletti A., Dorp L. van, Balloux F. Pre-existing T cell-mediated cross-reactivity to SARS-CoV-2 cannot solely be explained by prior exposure to endemic human coronaviruses // *Infection, Genetics and Evolution*. 2021. V. 95. P. 105075.
134. Tan L., Wang Q., Zhang D., Ding J., Huang Q., Tang Y.-Q., Wang Q., Miao H. Lymphopenia predicts disease severity of COVID-19: a descriptive and predictive study // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020a. V. 5. № 1. P. 33.

135. Tan M., Liu Y., Zhou R., Deng X., Li F., Liang K., Shi Y. Immunopathological characteristics of coronavirus disease 2019 cases in Guangzhou, China // *Immunology*. 2020b. V. 160. № 3. P. 261–268.
136. Tegally H., Wilkinson E., Giovanetti M., Iranzadeh A., Fonseca V., Giandhari J., Doolabh D., Pillay S., San E.J., Msomi N., Mlisana K., Gottberg A. von, Walaza S., Allam M., Ismail A., Mohale T., Glass A.J., Engelbrecht S., Zyl G. van, et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa // *Nature*. 2021. V. 592. № 7854. P. 438–443.
137. Thevarajan I., Nguyen T.H.O., Koutsakos M., Druce J., Caly L., Sandt C.E. van de, Jia X., Nicholson S., Catton M., Cowie B., Tong S.Y.C., Lewin S.R., Kedzierska K. Breadth of concomitant immune responses prior to patient recovery: a case report of non-severe COVID-19 // *Nature Medicine*. 2020. V. 26. № 4. P. 453–455.
138. Thieme C.J., Anft M., Paniskaki K., Blazquez-Navarro A., Doevelaar A., Seibert F.S., Hoelzer B., Konik M.J., Berger M.M., Brenner T., Tempfer C., Watzl C., Meister T.L., Pfaender S., Steinmann E., Dolff S., Dittmer U., Westhoff T.H., Witzke O., et al. Robust T Cell Response Toward Spike, Membrane, and Nucleocapsid SARS-CoV-2 Proteins Is Not Associated with Recovery in Critical COVID-19 Patients // *Cell Reports Medicine*. 2020. V. 1. № 6. P. 100092.
139. Tian X., Li C., Huang A., Xia S., Lu S., Shi Z., Lu L., Jiang S., Yang Z., Wu Y., Ying T. Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody // *Emerging Microbes & Infections*. 2020. V. 9. № 1. P. 382–385.
140. 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.

141. To K.K.-W., Tsang O.T.-Y., Leung W.-S., Tam A.R., Wu T.-C., Lung D.C., Yip C.C.-Y., Cai J.-P., Chan J.M.-C., Chik T.S.-H., Lau D.P.-L., Choi C.Y.-C., Chen L.-L., Chan W.-M., Chan K.-H., Ip J.D., Ng A.C.-K., Poon R.W.-S., Luo C.-T., et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study // *The Lancet Infectious Diseases*. 2020. V. 20. № 5. P. 565–574.
142. Tsai P.-H., Wang M.-L., Yang D.-M., Liang K.-H., Chou S.-J., Chiou S.-H., Lin T.-H., Wang C.-T., Chang T.-J. Genomic variance of Open Reading Frames (ORFs) and Spike protein in severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) // *Journal of the Chinese Medical Association*. 2020. V. 83. № 8. P. 725–732.
143. Turoňová B., Sikora M., Schürmann C., Hagen W.J.H., Welsch S., Blanc F.E.C., Bülow S. von, Gecht M., Bagola K., Hörner C., Zandbergen G. van, Landry J., Azevedo N.T.D. de, Mosalaganti S., Schwarz A., Covino R., Mühlebach M.D., Hummer G., Krijnse Locker J., et al. In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges // *Science (1979)*. 2020. V. 370. № 6513. P. 203–208.
144. Tyrrell D.A.J., Bynoe M.L. Cultivation of a Novel Type of Common-cold Virus in Organ Cultures // *BMJ*. 1965. V. 1. № 5448. P. 1467–1470.
145. Valkiers S., Houcke M. van, Laukens K., Meysman P. ClusTCR: a python interface for rapid clustering of large sets of CDR3 sequences with unknown antigen specificity // *Bioinformatics*. 2021. V. 37. № 24. P. 4865–4867.
146. Valpione S., Galvani E., Tweedy J., Mundra P.A., Banyard A., Middlehurst P., Barry J., Mills S., Salih Z., Weightman J., Gupta A., Gremel G., Baenke F., Dhomen N., Lorigan P.C., Marais R. Immune awakening revealed by peripheral T cell dynamics after one cycle of immunotherapy // *Nature Cancer*. 2020. V. 1. № 2. P. 210–221.
147. Vdovin A.S., Filkin S.Y., Yefimova P.R., Sheetikov S.A., Kapranov N.M., Davydova Y.O., Egorov E.S., Khamaganova E.G., Drovkov M.Y.,

- Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N., Efimov G.A., Savchenko V.G. Recombinant MHC tetramers for isolation of virus-specific CD8+ cells from healthy donors: Potential approach for cell therapy of posttransplant cytomegalovirus infection // *Biochemistry (Moscow)*. 2016. V. 81. № 11. P. 1371–1383.
148. Wajnberg A., Amanat F., Firpo A., Altman D.R., Bailey M.J., Mansour M., McMahon M., Meade P., Mendu D.R., Muellers K., Stadlbauer D., Stone K., Strohmeier S., Simon V., Aberg J., Reich D.L., Krammer F., Cordon-Cardo C. Robust neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 infection persist for months // *Science* (1979). 2020. V. 370. № 6521. P. 1227–1230.
149. Walker K., O'Donoghue K., Grace N., Dorling J., Comeau J., Li W., Thornton J. Maternal transmission of SARS-COV-2 to the neonate, and possible routes for such transmission: a systematic review and critical analysis // *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*. 2020. V. 127. № 11. P. 1324–1336.
150. Wang F., Hou H., Yao Y., Wu S., Huang M., Ran X., Zhou H., Liu Z., Sun Z. Systemically comparing host immunity between survived and deceased COVID-19 patients // *Cellular & Molecular Immunology*. 2020a. V. 17. № 8. P. 875–877.
151. Wang G., Wang Y., Jiang S., Fan W., Mo C., Gong W., Chen H., He D., Huang J., Ou M., Hou X. Comprehensive analysis of TCR repertoire of COVID-19 patients in different infected stage // *Genes & Genomics*. 2022. V. 44. № 7. P. 813–822.
152. Wang K., Chen W., Zhang Z., Deng Y., Lian J.-Q., Du P., Wei D., Zhang Y., Sun X.-X., Gong L., Yang X., He L., Zhang L., Yang Z., Geng J.-J., Chen R., Zhang H., Wang B., Zhu Y.-M., et al. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020b. V. 5. № 1. P. 283.
153. Wang X., Guo X., Xin Q., Pan Y., Hu Y., Li J., Chu Y., Feng Y., Wang Q. Neutralizing Antibody Responses to Severe Acute Respiratory Syndrome

- Coronavirus 2 in Coronavirus Disease 2019 Inpatients and Convalescent Patients // *Clinical Infectious Diseases*. 2020c. V. 71. № 10. P. 2688–2694.
154. Weiskopf D., Schmitz K.S., Raadsen M.P., Grifoni A., Okba N.M.A., Endeman H., Akker J.P.C. van den, Molenkamp R., Koopmans M.P.G., Gorp E.C.M. van, Haagmans B.L., Swart R.L. de, Sette A., Vries R.D. de. Phenotype and kinetics of SARS-CoV-2-specific T cells in COVID-19 patients with acute respiratory distress syndrome // *Science Immunology*. 2020. V. 5. № 48.
155. Wen W., Su W., Tang H., Le W., Zhang X., Zheng Y., Liu X., Xie L., Li J., Ye J., Dong L., Cui X., Miao Y., Wang D., Dong J., Xiao C., Chen W., Wang H. Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing // *Cell Discovery*. 2020. V. 6. № 1. P. 31.
156. Wheatley A.K., Juno J.A., Wang J.J., Selva K.J., Reynaldi A., Tan H.-X., Lee W.S., Wragg K.M., Kelly H.G., Esterbauer R., Davis S.K., Kent H.E., Mordant F.L., Schlub T.E., Gordon D.L., Khoury D.S., Subbarao K., Cromer D., Gordon T.P., et al. Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate COVID-19 // *Nature Communications*. 2021. V. 12. № 1. P. 1162.
157. Wichmann D., Sperhake J.-P., Lütgehetmann M., Steurer S., Edler C., Heinemann A., Heinrich F., Mushumba H., Kniep I., Schröder A.S., Burdelski C., Heer G. de, Nierhaus A., Frings D., Pfefferle S., Becker H., Bredereke-Wiedling H., Weerth A. de, Paschen H.-R., et al. Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With COVID-19 // *Annals of Internal Medicine*. 2020. V. 173. № 4. P. 268–277.
158. Wu D., Kolesnikov A., Yin R., Guest J.D., Gowthaman R., Shmelev A., Serdyuk Y., Dianov D. v., Efimov G.A., Pierce B.G., Mariuzza R.A. Structural assessment of HLA-A2-restricted SARS-CoV-2 spike epitopes recognized by public and private T-cell receptors // *Nature Communications*. 2022. V. 13. № 1. P. 19.
159. Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a

- Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. // JAMA. 2020. V. 323. № 13. P. 1239–1242.
160. Yang Y., Yang M., Peng Y., Liang Y., Wei J., Xing L., Guo L., Li X., Li J., Wang J., Li M., Xu Z., Zhang M., Wang F., Shi Y., Yuan J., Liu Y. Longitudinal analysis of antibody dynamics in COVID-19 convalescents reveals neutralizing responses up to 16 months after infection // Nature Microbiology. 2022. V. 7. № 3. P. 423–433.
161. Yao H., Song Y., Chen Y., Wu N., Xu J., Sun C., Zhang J., Weng T., Zhang Z., Wu Z., Cheng L., Shi D., Lu X., Lei J., Crispin M., Shi Y., Li L., Li S. Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus // Cell. 2020. V. 183. № 3. P. 730- 738.e13.
162. Yaqinuddin A. Cross-immunity between respiratory coronaviruses may limit COVID-19 fatalities // Medical Hypotheses. 2020. V. 144. P. 110049.
163. Zehn D., Lee S.Y., Bevan M.J. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen // Nature. 2009. V. 458. № 7235. P. 211–214.
164. Zhao J., Yuan Q., Wang H., Liu W., Liao X., Su Y., Wang X., Yuan J., Li T., Li J., Qian S., Hong C., Wang F., Liu Y., Wang Z., He Q., Li Z., He B., Zhang T., et al. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019 // Clinical Infectious Diseases. 2020. V. 71. № 16. P. 2027–2034.
165. Zhao J., Zhao J., Perlman S. T Cell Responses Are Required for Protection from Clinical Disease and for Virus Clearance in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-Infected Mice // Journal of Virology. 2010. V. 84. № 18. P. 9318–9325.
166. Zhao Y., Nguyen P., Ma J., Wu T., Jones L.L., Pei D., Cheng C., Geiger T.L. Preferential Use of Public TCR during Autoimmune Encephalomyelitis // The Journal of Immunology. 2016. V. 196. № 12. P. 4905–4914.
167. Zheng M., Gao Y., Wang G., Song G., Liu S., Sun D., Xu Y., Tian Z. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients // Cellular & Molecular Immunology. 2020. V. 17. № 5. P. 533–535.

168. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F., Tan W. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019 // *New England Journal of Medicine*. 2020. V. 382. № 8. P. 727–733.
169. Zinkernagel R.M., Hengartner H. Protective ‘immunity’ by pre-existent neutralizing antibody titers and preactivated T cells but not by so-called ‘immunological memory’ // *Immunological Reviews*. 2006. V. 211. № 1. P. 310–319.
170. Zvyagin I. v, Mamedov I.Z., Tatarinova O. v, Komech E.A., Kurnikova E.E., Boyakova E. v, Brilliantova V., Shelikhova L.N., Balashov D.N., Shugay M., Sycheva A.L., Kasatskaya S.A., Lebedev Y.B., Maschan A.A., Maschan M.A., Chudakov D.M. Tracking T-cell immune reconstitution after TCR $\alpha\beta$ /CD19-depleted hematopoietic cells transplantation in children // *Leukemia*. 2017. V. 31. № 5. P. 1145–1153.