

ИНСТИТУТ ОБЩЕЙ ГЕНЕТИКИ имени Н.И. ВАВИЛОВА РАН

На правах рукописи

Алисейчик Мария Павловна

Иммуногенетические факторы болезни Альцгеймера: анализ Т-клеточного репертуара

Специальность 03.03.03 – Иммунология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, профессор,
член-корреспондент РАН

Рогаев Евгений Иванович

Москва - 2020

Оглавление

Список Сокращений.....	3
Введение.....	5
Обзор литературы.....	11
Функции $\gamma\delta$T-клеток	11
Роль $\gamma\delta$ T-клеток в защите организма от бактериальных и вирусных инфекций.....	11
Роль $\gamma\delta$ T-клеток в регуляции иммунной системы.....	12
Роль $\gamma\delta$ T-клеток в защите организма от опухолей.....	15
Роль $\gamma\delta$ T-клеток в поддержании тканевого гомеостаза и индукции иммунологической толерантности.....	15
Особенности репертуара $\gamma\delta$T-клеток	16
Строение TRG и TRD локуса.....	16
Композиция репертуара $\gamma\delta$ T-клеток.....	17
Субпопуляция V γ 9V δ 2.....	19
Известные антигены $\gamma\delta$ T-клеток.....	20
Факторы, влияющие на репертуар $\gamma\delta$ T-клеток.....	24
Болезнь Альцгеймера и другие нейродегенеративные заболевания	24
Нейродегенерация и врожденный иммунный ответ.....	27
Нейродегенерация и адаптивный иммунитет.....	28
$\gamma\delta$T-клетки при различных заболеваниях центральной нервной системы	29
Материалы и методы.....	32
МАТЕРИАЛЫ	32
Биологические образцы.....	32
Расходные материалы.....	32
МЕТОДЫ	32
Методы работы с нуклеиновыми кислотами.....	32
Методы получения репертуаров CDR3 регионов TRG человека.....	34
Методы иммуногистохимии.....	37
Методы биоинформатического анализа.....	38
Методы статистического анализа.....	38
Результаты и Обсуждения.....	40
Оптимизация метода получения репертуаров TRG человека	40
Оценка воспроизводимости получаемых результатов	41
Анализ репертуаров CDR3 регионов TRG Человека	44
<i>Оценка выборки анализируемых образцов</i>	44
<i>Возрастные изменения репертуара TRG человека</i>	46

<i>Сравнение репертуаров TRG головного мозга и периферической крови человека.</i>	55
<i>Особенности TRG репертуара индивидов с болезнью Альцгеймера</i>	60
Заключение	76
Выводы	78
Список литературы	79
Благодарности	92
Приложение 1	93
Приложение 2	99

Список Сокращений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

IFN γ – интерферон гамма

IL – интерлейкин

IGF – инсулиноподобный фактор роста

EGF – эпидермальный фактор роста

KGF – фактор роста кератиноцитов

TNF – фактор некроза опухоли

TGF β – трансформирующий ростовой фактор бета

CMV – цитомегаловирус

EBV – вирус Эпштейна — Барр

БЦЖ – Бацилла Кальметта — Герена

IgE – иммуноглобулин E

ДК – дендритные клетки

АПК – антиген презентирющие клетки

NK – натуральный киллер

MDSC – супрессорные клетки миелоидного происхождения

ТКР – Т-клеточный рецептор

CDR3 – «Complementarity-determining region»

RSS – сигнальные последовательности рекомбинации

АТГСК – аллогенная трансплантация гематопозитических стволовых клеток

BTN3A1 – белок семейства бутирофилинов 3 A1

СНО – клетки яичников китайских хомячков

БА – болезнь Альцгеймера

БП – болезнь Паркинсона

ФС – «frontal cortex», лобная доля

ТС – «temporal cortex», височная доля

ЦНС – центральная нервная система

МНСII – молекула главного комплекса гистосовместимости II класса

TLR – Толл-подобные рецепторы

АРОЕ – аполипопротеин E

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ROX – 5-карбоксих-родамин

ПААГ – полиакриламидный гель

ТВЕ – ТРИС-борат-ЭДТА буфер

ERM – End Repair Mix (Illumina)

RSB – Resuspension Buffer (Illumina)

ATL – A-Tailing Mix (Illumina)

LIG2 – Ligation Mix 2 (Illumina)

OCT – Optimal Cutting Temperature compound

PFA – параформальдегид

PBS – натрий-фосфатный буфер

NSB – блокирующий раствор из нормальной сыворотки

IPP – изопентил пиррофосфат

DEPC – диэтилпиракарбонат (ингибитор рибонуклеаз)

dNTP – смесь дезоксинуклеотидов

Введение

Актуальность и степень разработанности темы исследования

В последнее время растет внимание к вопросу взаимодействия центральной нервной системы (ЦНС) и системы иммунитета как в норме, так и при различных неврологических нарушениях. Разбалансировка одной системы вследствие патологического процесса или старения организма, может повлечь за собой изменения в другой системе. Так, согласно последним исследованиям, нарушения в функционировании иммунной системы могут служить дополнительным фактором развития нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера [1–3]. Одной из отличительных особенностей данной патологии является образование сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубков в головном мозге, состоящих из бета-амилоидного пептида и тау-белка, соответственно. Накопление данных конгломератов ведет к нарушениям синаптических связей и гибели нейронов, особенно лимбической системы и ассоциативной коры головного мозга, которые играют важную роль в механизмах памяти [4]. В результате прогрессирующая болезнь Альцгеймера (БА) ведет к нарушению когнитивных функций. Около 5% от всех случаев данного заболевания имеет генетическую природу. Исследование семей с наследственными формами БА привело к выявлению ряда генов, мутации в которых приводят к развитию нейродегенеративных патологий. Так, были описаны мутации в генах *APP* (белок-предшественник амилоида), *PSEN1* (пресенилин 1) и *PSEN2* (пресенилин 2) [5–7]. ε4 аллель гена аполипопротеина E является еще одним генетическим фактором риска развития БА, подтвержденным в популяционных исследованиях [8,9]. Накопление бета-амилоидного пептида в результате расщепления гамма-секретазами трансмембранного белка предшественника амилоида запускает патологические процессы, приводящие к гибели нейронов. В связи с этим, многочисленные исследования были посвящены разработке и клиническим испытаниям препаратов, влияющих на продукцию бета-амилоида и накопление амилоидных бляшек. Однако результаты клинических испытаний не показали существенного терапевтического эффекта таких препаратов. Так, ингибиторы гамма-секретазы не прошли последние стадии клинических исследований вследствие высокой токсичности для мозга и побочных эффектов в виде развития рака кожи [10]. Препятствиями для поиска препаратов также выступают такие факторы, как плохая проницаемость гематоэнцефалического барьера для препаратов, поздняя диагностика заболевания и высокий уровень бета-амилоида у пациентов на момент обнаружения патологии.

В настоящее время известно, что помимо накопления токсичного белка в клетках болезнь Альцгеймера характеризуется значительным уровнем нейровоспаления [11,12]. Патологические белковые отложения (α -синуклеина, β -амилоида) способны активировать микроглиальные клетки, что индуцирует продукцию провоспалительных цитокинов (TNF, IL-1, IL-6), а также генерацию активных форм кислорода. С одной стороны, активация микроглии сопровождается фагоцитозом клеточного дебриса и токсических белковых отложений. С другой стороны, воспалительные процессы в ЦНС оказывают негативное воздействие на клетки головного мозга, в конечном итоге, вызывая нарушение их функций и гибель [13,14]. Согласно эпидемиологическим исследованиям, длительное применение нестероидных противовоспалительных препаратов снижает риск возникновения болезни Альцгеймера [15]. В дополнение к этому, у пациентов с деменцией в структурах мозга и спинно-мозговой жидкости повышены уровни различных медиаторов иммунной системы, таких как факторы комплемента, эйкозаноиды, различные хемокины и цитокины [16]. Известно, что развитие инфекционных заболеваний у пациентов с болезнью Альцгеймера приводит к ускорению развития патологии и нарушению когнитивных функций [17]. До сих пор остается открытым вопрос, предшествует ли инфекция накоплению бета-амилоида в клетках мозга, тем не менее все большее количество исследований подтверждает связь развития деменции с активацией иммунной системы. Таким образом, определение роли иммунитета и поиски новых молекулярных мишеней для диагностирования и лечения болезни Альцгеймера представляет собой перспективное направление исследований этиологии данного заболевания и играет важную роль в развитии успешной терапии нейродегенеративных заболеваний.

Целью работы являлось изучение особенностей репертуаров гамма цепи T-клеточного рецептора (TRG) у индивидов с болезнью Альцгеймера, а также оценка влияния возраста доноров, ткани и других параметров на анализируемые репертуары.

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

1. Разработать методику получения репертуаров гипервариабельных регионов (CDR3) TRG из ДНК и РНК человека методом глубокого секвенирования.
2. Сравнить репертуары TRG, полученные из разных тканей (коры головного мозга и периферической крови).
3. Описать изменения, происходящие в репертуарах TRG с возрастом.
4. Выявить характерные черты TRG репертуаров, полученных из крови или мозга индивидов с болезнью Альцгеймера, в сравнении с группой доноров без нейродегенеративных патологий.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования являлась иммунная компонента в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, в частности, болезни Альцгеймера. Предметом исследования стали T-клеточные репертуары, полученные из периферической крови и коры головного мозга.

Научная новизна работы

Впервые были получены профили TRG выборки пациентов с диагностированной болезнью Альцгеймера. Дополнительно были приготовлены и отсекуированы библиотеки TRG из образцов доноров без нейродегенеративных патологий и также с болезнью Паркинсона. В результате сравнительного анализа были выявлены физико-химические свойства CDR3 регионов клонотипов, экспансия которых характерна для индивидов с БА.

Также, насколько нам известно, впервые были использованы замороженные образцы коры головного мозга человека в качестве материала для получения TRG репертуаров методом глубокого секвенирования. Благодаря этому впервые удалось выявить отличия в архитектуре TRG профилей, полученных из коры головного мозга, от профилей периферической крови.

Теоретическая и практическая значимость работы

В связи с тем, что болезнь Альцгеймера до сих пор остается неизлечимым заболеванием, поиск маркеров для ранней диагностики, а также поиск новых подходов к терапии данного расстройства - являются актуальными задачами современной науки и медицины. В этом контексте составленный в ходе данной работы список клонотипов CDR3 регионов TRG, увеличение численности которых характерно для больных БА, имеет не только фундаментальное, но и потенциально практическое значение. Последующее изучение TRG с описанными аминокислотными последовательностями CDR3 может привести к нахождению новых антигенов, которые участвуют в процессе нейродегенерации, тем самым поможет уточнить механизмы патогенеза болезни Альцгеймера. Отобранные клонотипы после дальнейшей проверки на большой выборке пациентов, а также после дифференциального анализа с другими нейропсихическими заболеваниями, могут стать дополнительными диагностическими параметрами. С другой стороны, описание фенотипа T-клеток, ассоциированных с наличием заболевания или присутствующих в коре головного мозга, анализ продуцируемых ими растворимых факторов, в совокупности с эффектом, оказываемом на течение болезни, открывает перспективы применения иммуномодуляторов в качестве терапии БА.

Предложенный в данной работе биоинформатический подход к поиску клонотипов, характерных для одной группы пациентов в сравнении контрольной группой, представляет собой отдельный практический интерес, так как может быть применен к различным репертуарам Т- и В- клеточных рецепторов, а также к различным заболеваниям.

Описанные возрастные изменения в репертуаре TRG согласуются с результатами исследований репертуаров ТКР других исследовательских групп. Однако, так как информация об изменении разнообразия Т- и В- клеток с возрастом в популяции чрезвычайно важна в эпидемиологическом контексте, а также в контексте массовой вакцинации, данные секвенирования репертуаров большой выборки людей пожилого возраста представляют отдельную значимость, так как могут быть использованы в масштабных популяционных исследованиях.

Обнаруженные отличия между TRG репертуарами периферической крови и головного мозга представляют собой особый интерес в контексте фундаментальной науки, так как перемещение, функции и вклад в развитие нейропсихиатрических патологий иммунных клеток, обнаруженных в ЦНС, до сих пор остаются практически неизученными.

Методология и методы исследования

В качестве материала для выделения ДНК или РНК использовали замороженные образцы из коллекции периферической крови российских пациентов с болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона и доноров без нейродегенеративных патологий. Также были использованы замороженные образцы участков лобной и височной коры головного мозга из коллекций, составленных на основе материалов, присланных различными банками тканей США. Для получения профилей CDR3 регионов TRG использовали метод мультиплексной ПЦР с набором праймеров на TRGV и TRGJ сегменты человека. Из очищенных ПЦР-продуктов путем лигирования адаптеров получали библиотеки для глубокого секвенирования на платформе MiSeq (Illumina). Молярность библиотек определяли методом ПЦР в реальном времени. Для обработки полученных данных секвенирования применяли программы MiXCR, VDJTools и собственные алгоритмы.

Для подтверждения наличия $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в образцах головного мозга использовали метод конфокальной микроскопии. Для этого с помощью криотома были приготовлены срезы, зафиксированы, обработаны гасителем липофусцина, гибридизованы с флуоресцентно-мечеными антителами к CD3 и гамма-дельта ТКР.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Репертуары CDR3 регионов гамма цепи Т-клеточного рецептора, полученные из коры головного мозга, отличаются от репертуаров, полученных из периферической крови

человека, частотами клонотипов, образованных с использованием TRGV9 и TRGV2/TRGV4/TRGV8 сегментов, а также более низким средним индексом гидропатии.

2. Для TRG профилей доноров более пожилого возраста характерны менее разнообразные репертуары и, в среднем, более короткие последовательности CDR3 регионов в периферической крови. Также для репертуаров, полученных из коры головного мозга, характерно снижение частоты TRGV9-клонотипов и увеличение частоты TRGV2/TRGV4/TRGV8-клонотипов в процессе старения.

3. Болезнь Альцгеймера сопровождается накоплением в головном мозге Т-клеток, CDR3 регионы TRG которых богаты гидрофильными и более объемными аминокислотными остатками, а в периферической крови – более слабыми по силе взаимодействия и короткими CDR3.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов данного исследования основана на использовании современных методов экспериментальной биологии, а также математических и статистических критериев для обработки данных. Научные выводы, сформулированные в диссертации, подкреплены расчетами, результаты которых приведены на рисунках и в таблицах.

Апробация результатов и публикации

Результаты данной диссертационной работы были представлены на международных и отечественных конференциях, а также на научных школах: Symposium of Cognitive Sciences, Genomics and Bioinformatics, Россия, Новосибирск, 29-30 августа 2016; Международная конференция и семинар-школа для молодых ученых «Aging and Memory», Россия, Москва, 8-9 декабря 2016; Научно-образовательная школа-конференция по генетике и биотехнологиям, Россия, Сочи, Сириус, 18-22 августа 2017; Саммит молодых ученых и инженеров «Большие вызовы для общества, государства и науки», Россия, Сочи, Сириус, 14-19 октября 2018; Форум QIAGEN Day, Россия, Москва, 4 апреля 2019; Конференция и школа молодых ученых «Genes. Brain. Behaviour», Россия, Москва, 9 декабря 2019; Alzheimer's Association International Conference, Virtual Event, 27-31 июля 2020.

По теме диссертации опубликовано 5 печатных работ: 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, РИНЦ и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.03.03 – иммунология, а также 1 тезисы.

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

1. Arya Biragyn, **Maria Aliseychik**, Evgeny Rogaev. Potential importance of B cells in aging and aging-associated neurodegenerative diseases. // Semin. Immunopathol., 2017. 39 p. 283–294 Импакт-фактор (WoS) – 6.804
2. **Алисейчик М.П.**, Андреева Т.В., Робаев Е.И. Иммуногенетические факторы нейродегенеративных заболеваний: Роль HLA II класса. // БИОХИМИЯ, 2018. том 83, вып. 9, с. 1385 – 1398 Импакт-фактор (WoS) – 1.886
3. Gusev FE, Reshetov DA, Mitchell AC, Andreeva TV, Dincer A, Grigorenko AP, Fedonin G, Halene T, **Aliseychik M**, Filippova E, Weng Z, Akbarian S, Rogaev EI. Chromatin profiling of cortical neurons identifies individual epigenetic signatures in schizophrenia. // Transl Psychiatry, 2019. 17;9(1):256 Импакт-фактор (WoS) – 5.182
4. **Aliseychik M**, Patrikeev A, Gusev F, Grigorenko A, Andreeva T, Biragyn A, Rogaev E. Dissection of the Human T-Cell Receptor γ Gene Repertoire in the Brain and Peripheral Blood Identifies Age- and Alzheimer's Disease-Associated Clonotype Profiles. //Front Immunol., 2020. 29;11:12 Импакт-фактор (WoS) – 4.716

Тезисы конференций:

1. **Aliseychik M.**, Zolotoreva O., Gusev F., Grigorenko A., Byragin A., Andreeva T., Rogaev E. Analysis of gdT-cell repertoire in Alzheimer's disease patients and individuals with no memory impairment. //SYMPOSIUM "COGNITIVE SCIENCES, GENOMICS AND BIOINFORMATICS" (CSGB-2016) (p. 9)

Личный вклад автора

Основные данные и результаты, представленные в этой работе, были получены автором или при его участии. Личный вклад автора включает: разработку методик, приготовление библиотек для глубокого секвенирования, планирование и проведение экспериментов, анализ полученных результатов, подготовку публикаций и написание текста диссертации. Имена соавторов указаны в приведенных ниже публикациях.

Обзор литературы

Адаптивный иммунитет – важная система организма, осуществляющая специфическую защиту от патогенов и обеспечивающая иммунологическую память, которая позволяет быстро и эффективно элиминировать патоген при повторном заражении. Механизм адаптивного иммунного ответа реализуется благодаря генам иммуноглобулинов, которые, в результате соматической геномной перестройки (VDJ-рекомбинации), образуют уникальную последовательность рецептора, специфичного для конкретного антигена. Существуют три основные популяции лимфоцитов, определяющиеся перестроенными локусами иммуноглобулиновых генов: В-лимфоциты, $\alpha\beta$ Т-лимфоциты и $\gamma\delta$ Т-лимфоциты. Последние представляют собой минорную популяцию клеток периферической крови и обычно составляют менее 10% от всех мононуклеаров [18]. $\gamma\delta$ Т-лимфоциты, в сравнении с В- и $\alpha\beta$ Т-лимфоцитами, менее изучены. Как и для других популяций лимфоцитов, для $\gamma\delta$ Т-клеток характерно деление на субпопуляции, которые различаются фенотипически (поверхностными клеточными маркерами и экспрессируемыми факторами) и функционально, при том уникальной особенностью является то, что некоторые субпопуляции характеризуются наличием определенной перестройки ТКР.

Главной фенотипической особенностью $\gamma\delta$ Т-клеток является экспрессия на поверхности Т-клеточного рецептора, состоящего из γ - и δ -цепей. Белковая последовательность рецептора определяется нуклеотидной последовательностью, образовавшейся вследствие перестройки TRG и TRD локусов соответственно. В отличие от $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов, $\gamma\delta$ Т-клетки преимущественно обладают фенотипом $CD4^-CD8^-$, <1% являются $CD4^+$; и около 30% $CD8^+\alpha\alpha$ [18].

Хотя формально $\gamma\delta$ Т-клетки относятся к адаптивному звену иммунной системы, ввиду наличия перестроенных иммуноглобулиновых генов, многие особенности функционирования этой популяции более характерны для системы врожденного иммунитета. Поэтому $\gamma\delta$ Т-клетки считаются промежуточным звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом и участвуют в процессах, относящихся к обеим системам.

Функции $\gamma\delta$ Т-клеток

Роль $\gamma\delta$ Т-клеток в защите организма от бактериальных и вирусных инфекций

Классическая функция $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов, как части иммунной системы, – это защита организма от инвазии чужеродных агентов. $\gamma\delta$ Т-клетки посредством цитокинов могут формировать протективный иммунитет от вирусов и внутриклеточных патогенов (TNF и $IFN\gamma$), бактерий и грибов (IL-17) и внеклеточных паразитов (IL-4, IL-5, IL-13) [19]. Также

$\gamma\delta$ T-клетки способны реализовывать эффекторные функции и убивать зараженные клетки как через FAS-рецептор или TRAILR, так и с помощью цитотоксических молекул, таких как гранзимы и перфорины. [20,21] Стимулы, активирующие $\gamma\delta$ T-клетки, могут быть неспецифическими, такими как фосфорилированные пренил-метаболиты или стрессорные молекулы, и в этом контексте, $\gamma\delta$ T-клетки можно отнести скорее к системе врожденного иммунитета [22]. Однако, для таких вирусных заболеваний, как, например, цитомегаловирус (CMV) и вирус Эпштейна-Барр (EBV) было показано изменение репертуара $\gamma\delta$ T-клеток: появление доминантных клонов в ответ на инфекцию [23,24]. В этом случае, вероятно, $\gamma\delta$ T-клетки являются частью адаптивного иммунного ответа. Более того, было показано, что эффективность $\gamma\delta$ T-клеток (большой частью имеющих фенотип эффекторных клеток памяти) в борьбе с CMV не зависит от $\alpha\beta$ T-, В- или NK- клеток [25]. Протекторные $\gamma\delta$ T-клетки также были получены к гликопротеину вируса герпеса (HSV) [26].

$\gamma\delta$ T-клетки играют важную роль в борьбе с микобактериями, сопровождающейся увеличением популяции V γ 9V δ 2 клеток (см. ниже), которые, как принято считать, неспецифически активируются фосфоантигенами. Однако было показано, что $\gamma\delta$ T-клетки, активированные, в первом случае изопентил пирозинатом (IPP), а в другом случае бактериями Кальметта — Герена (БЦЖ), демонстрируют разную эффективность в защите от патогена и приводят к отбору разных клонов V γ 9V δ 2 [27]. Это говорит о том, что $\gamma\delta$ T-лимфоциты способны формировать специфичный ТКР-опосредованный иммунный ответ, но в то же время, они способны активироваться и в ответ на неспецифичный сигнал, возможно, через другие поверхностные рецепторы.

Протективная роль $\gamma\delta$ T-лимфоцитов была показана для целого спектра патогенов. Так, например, мыши, дефицитные по гену *tcrd*, без которого невозможна сборка $\gamma\delta$ ТКР, демонстрируют повышенную чувствительность к инфекциям, вызванным *Nocardia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Pseudomonas* и пр. [28].

Роль $\gamma\delta$ T-клеток в регуляции иммунной системы

$\gamma\delta$ T-клетки, благодаря широкому спектру продуцируемых сигнальных молекул, способны регулировать различные ветви иммунной системы, взаимодействуя при этом с клетками врожденного иммунитета: нейтрофилами, макрофагами, NK-клетками, базофилами и эозинофилами, а также адаптивного иммунитета: Т- и В- лимфоцитами, дендритными клетками (Таблица 1). Интересно, что в процессах врожденного иммунного ответа $\gamma\delta$ T-лимфоциты могут быть частью первой линии защиты, наряду с нейтрофилами, и сигнал от

ТКР в этом случае, по всей видимости, не играет ключевой роли. Так, было показано, что обособленная популяция $\gamma\delta$ T-клеток обеспечивает первую (раннюю) волну экспрессии IL-17 в ответ на острую инфекцию, что привлекает в центр воспаления нейтрофилов, и происходит значительно раньше, чем формируется $\alpha\beta$ T-клеточный ответ. При этом продуцирующие IL-17 $\gamma\delta$ T-клетки, являются пред-программированными и отличаются низким разнообразием репертуара [29]

В контексте работы адаптивного иммунитета $\gamma\delta$ T-клетки влияют на такие процессы, как презентация антигена и продукция антител, при том они могут влиять на процесс косвенно (посредством продуцируемых факторов) или непосредственно, реализуя функцию презентации антигена или клеточной костимуляции.

$\gamma\delta$ T-клетки, активированные с помощью IPP или памидроната, вызывают увеличение экспрессии CD86 и MHC I класса на поверхности незрелых дендритных клеток (ДК). Активация ДК в культуре с $\gamma\delta$ T-клетками обусловлена продукцией TNF α и IFN γ , и, в некоторых случаях, прямым клеточным контактом. Более того, в данном случае, активация является реципрокной [30].

В отдельных случаях, $\gamma\delta$ T-клетки способны индуцировать синтез антител В-клетками в отсутствие $\alpha\beta$ T-клеток, в особенности IgE класса [31].

Было показано, что популяция клеток V γ 2V δ 2 обладает характеристиками профессиональных антиген-презентирующих клеток (АПК), таких как дендритные клетки. При активации они способны процессировать и презентировать антигены на своей поверхности в составе комплекса MHC I и II классов, а также экспрессировать костимуляторные молекулы, в особенности CD80 и CD86, необходимые для индукции пролиферации и дифференциации $\alpha\beta$ T-клеток. Активация V γ 2V δ 2 сопровождается экспрессией CCR7 и миграцией в лимфатические узлы [32].

Особое место занимают $\gamma\delta$ T-клетки с чертами регуляторных клеток. Они способны ингибировать врожденный и адаптивный иммунитет посредством иммуносупрессорных цитокинов, таких как IL-10 и TGF β [19] и представляют особый интерес в контексте регуляции хронического воспаления, развивающегося при старении и различных патологиях.

Таблица 1. Факторы, продуцируемые $\gamma\delta$ T-клетками (по Pierre Vantourout and Adrian Hayday, 2014 с изменениями) [22]

Человек			
Популяция	Хемокин	Клетки-мишени	Ссылка
V δ 2 (IPP)	CCL3 (MIP1 α)	макрофаги	[33]
	CCL4 (MIP1 β)	Макрофаги, NK клетки, другие	
	CXCL10	макрофаги, Т-клетки, NK-клетки, другие	
	CXCL13	В-клетки	
V δ 1 (NKp30)	CCL3 (MIP1 α)	макрофаги	[34]
	CCL4 (MIP1 β)	макрофаги, NK-клетки, другие	
	CCL5 (RANTES)	Т-клетки, эозинофилы, базофилы	
V δ 2 кожи	CCL1	Моноциты, NK-клетки, незрелые В-клетки	[35]
Мышь			
резиденты легких	CXCL1	нейтрофилы	[36]
	CXCL10	Макрофаги, Т-клетки, NK-клетки, другие	
Перитониальные V δ 1	CCL3 (MIP1 α)	Макрофаги	[37]
	CCL5 (RANTES)	Т-клетки, эозинофилы, базофилы	
DETC	CCL3 (MIP1 α)	Макрофаги	[38,39]

	CCL4 (MIP1 β)	Макрофаги, NK-клетки, другие
	CCL5 (RANTES)	T-клетки, эозинофилы, базофилы
	XCL1	CD8 ⁺ клетки

Роль $\gamma\delta$ T-клеток в защите организма от опухолей

В последнее время возрастает внимание к $\gamma\delta$ T-клеткам в связи с их противоопухолевой активностью и способностью распознавать антигены вне комплекса с МНС. В опухолевых клетках в результате гиперэкспрессии гидроксид-метилглутарил-КоА редуктазы накапливаются метаболиты мевалонатного пути, в том числе IPP, что приводит к активации $\gamma\delta$ T-клеток [40]. Помимо фосфоантигенов $\gamma\delta$ T-клетки могут распознавать другие стрессорные молекулы на поверхности опухолевых клеток: липиды в составе CD1d-молекулы [41], HSP60 [42], EPCR [43], MICA и MICB [44]. Большинство из перечисленных молекул являются МНС-подобными молекулами, увеличивающимися на поверхности клетки вследствие клеточного стресса. Более того, $\gamma\delta$ T-клетки экспрессируют NK-клеточные рецепторы, например, NKG2D, с помощью которых также могут контролировать рост опухоли [45].

С одной стороны, иногда наличие в опухоли большого числа $\gamma\delta$ T-клеток ассоциировано с благоприятным прогнозом, например, в случае рака молочной железы. С другой стороны, $\gamma\delta$ T-клетки, инфильтрирующие опухоль, могут обладать супрессорным фенотипом, усиливать аккумуляцию MDSC (миелоидных супрессорных клеток), экспрессировать проопухолевые цитокины, тем самым провоцируя рост опухоли [46].

Роль $\gamma\delta$ T-клеток в поддержании тканевого гомеостаза и индукции иммунологической толерантности.

Как уже упоминалось ранее, важной особенностью $\gamma\delta$ T-клеток является то, что в отличие от периферической крови, где они являются минорной популяцией, в барьерных тканях эти клетки представляют собой большинство всех T-лимфоцитов. В таких тканях как эпителий кожи и кишечника, слизистая легких и репродуктивных трактов, $\gamma\delta$ T-клетки иногда могут насчитывать до 100% от всех T-лимфоцитов. Тканеспецифические $\gamma\delta$ T-клетки отличаются

экспрессией характерных для той или иной ткани рецепторов и низким разнообразием репертуара ТКР [47].

В коже $\gamma\delta$ T-клетки имеют разветвленную структуру и контактируют с кератиноцитами, клетками Лангерганса и меланоцитами, что увеличивает их чувствительность к стрессу и развитию различных патологий кожи. Продуцируемый данной субпопуляцией $\gamma\delta$ T-клеток IGF1 является фактором выживания кератиноцитов. При репарации тканей $\gamma\delta$ T-клетки продуцируют EGF1 (эпителиальный фактор роста), KGF1 и KGF2 (факторы роста кератиноцитов), которые обеспечивают заживление ран [19]. KGF1, продуцируемый $\gamma\delta$ T-клетками, также необходим для поддержания пролиферации других типов эпителиальных клеток, например, клеток кишечника. Также в ряде исследований отдельное место отведено способности регулировать воспаление на тканевом уровне, например, экспрессия фактора роста TGF β позволяет сдерживать воспаление, индуцируемое $\alpha\beta$ T-клетками [48].

Наконец, ключевую роль $\gamma\delta$ T-клетки играют в поддержании толерантности к пищевым антигенам, симбионтам кишечника и аутоантигенам. Иммунологическая толерантность – это активное состояние иммунной системы, направленное на ареактивность в отношении конкретных антигенов. В отсутствие $\gamma\delta$ T-клеток, при пероральном введении овальбумина не формируется иммунологическая толерантность [49]. На мышинной модели диабета 1 типа, который развивается при удалении тимуса, было показано, что пересаженные $\gamma\delta$ T-клетки из мыши с тимусом эмигрируют в тонкий кишечник и предотвращают развитие аутоиммунной патологии [50].

Особенности репертуара $\gamma\delta$ T-клеток

Строение TRG и TRD локуса

Гены T-клеточного рецептора относятся к семейству иммуноглобулинов. В генетическом локусе ТКР содержатся различные сегменты, которые можно отнести к одной из четырех групп: V (“variable”), D (“diversity”), J (“joining”) или C (“constant”) [51] (Рисунок 1). При этом D-сегменты отсутствуют в TRG локусе, а есть только в TRD. В результате процесса VDJ-рекомбинации образуется случайная комбинация этих сегментов, что обеспечивает разнообразие белковых последовательностей ТКР. Наиболее полиморфным принято считать участок V-J, который обозначается как CDR3 регион (“Complementarity-determining regions”), CDR1 и CDR2 менее вариативны и часто не входят в панели для глубокого секвенирования иммунных репертуаров [52].

В VDJ-рекомбинации участвует белковый комплекс, куда входят белки RAG1 и RAG2, терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза (ТдТ), нуклеаза *Artemis*, которая также

участвует в репарации двунитевых разрывов ДНК. Рекомбинационный комплекс распознает консервативные некодирующие участки RSS (recombination signal sequences), которые фланкируют V-, D-, J-, C-сегменты. RSS состоит из крайне консервативных последовательностей гептамера CACAGTG и нонамера ACAAAAACC, а также неконсервативного по последовательности, но консервативного по длине (12 или 23 п.н.) спейсера между ними. При соединении сегментов работает правило «12/23», которое обеспечивает использование RSS со спейсером разной длины. Разнообразие нуклеотидных последовательностей ТКР обеспечивается случайной комбинацией использованных сегментов, разными точками стыковки сегментов, а также дополнительными вставками внематричных нуклеотидов (N-вставкой)[53].

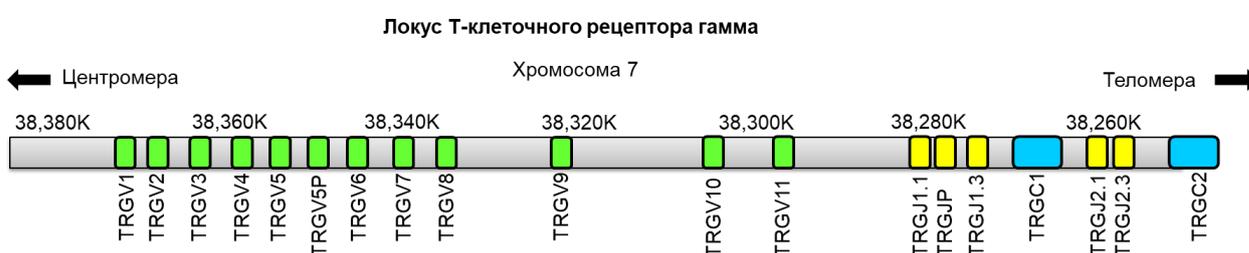


Рисунок 1 Структура локуса Т-клеточного рецептора человека TRG

Зеленым обозначены переменные TRGV сегменты, желтым – TRGJ сегменты и голубым – константные TRGC сегменты.

В процессе Т-клеточной дифференциации первыми перестраиваются TCRD гены, потом TCRG. Если обе цепи ТКР успешно перестроились, что привело к экспрессии функционального белкового комплекса, далее клетка развивается как $\gamma\delta$ Т-клетка. Если в результате VDJ-рекомбинации из-за образования стоп-кодона, сдвига рамки считывания или других причин, гетеродимер не образуется, то перестраиваются TCRB гены, а потом TCRA. То есть локусы TRG и TRD в $\alpha\beta$ Т-клетках всегда перестроены, но, большей частью, они нефункциональны [54].

Особенностью локусов TRG и TRD, как у человека, так и у мыши, является небольшое количество V-сегментов, по сравнению с TRA и TRB.

Композиция репертуара $\gamma\delta$ Т-клеток

Т-клеточный репертуар – это совокупность всех присутствующих в организме Т-клеток, характеризующихся последовательностью перестроенных ТКР. В большинстве случаев, в тимусе генерируется набор клонов с уникальной последовательностью, однако после экспонирования организма инфекциям, аллергенам, аутоантигенам, опухолям - клетки, получившие сигнал через ТКР, начинают пролиферировать, следовательно, их частота в

общем пуле увеличивается. Таким образом, в раннем периоде жизни разнообразие репертуара очень высоко и определяется наивными Т-лимфоцитами, в то время как при старении пул Т-клеток начинает обогащаться центральными и эффекторными клетками памяти, что приводит к изменению архитектуры репертуара, в котором образуются клонотипы с более высокими частотами, что ведет к снижению общего разнообразия. Анализируя репертуар Т-лимфоцитов, можно сделать приблизительные выводы о возрасте, активной фазе инфекции, а также о перенесенных в прошлом заболеваниях. К факторам, помимо возраста и инфекций, которые способны сильно изменять иммунный репертуар индивида, можно отнести некоторые генетические, аутоиммунные и онкологические заболевания; лекарственные препараты, воздействующие на иммунную систему; трансплантацию костного мозга; радиоактивное облучение.

При высокой информативности данных, получаемых при анализе иммунных репертуаров, стоит отметить очевидные ограничения, связанные с невозможностью исследовать полный репертуар организма, а также индивидуальность иммунного ответа (в ответ на один и тот же антиген часто образуются разные клонотипы) из-за чего на данный момент не существует адекватного алгоритма предсказания антигена по аминокислотной последовательности ТКР или наоборот.

В отличие от крайне разнообразного репертуара $\alpha\beta$ Т-клеток, репертуар $\gamma\delta$ Т-клеток принято считать олигоклональным, но индивидуальным и сравнительно постоянным. В целом Топ20 $\gamma\delta$ Т-клонотипов составляют около 60% от всех TRG в периферической крови взрослых индивидов. В том числе это достигается, например, благодаря тому, что в периферической крови человека находится мажорная субпопуляция семи-вариантных V γ 9V δ 2 Т-клеток, которые, по всей видимости, не специфичны к конкретному антигену и являются частью врожденного иммунитета (см. раздел Субпопуляция V γ 9V δ 2). При бактериальной инфекции у некоторых пациентов V γ 9V δ 2 Т-клетки могут составлять более 50% от всех циркулирующих Т-клеток крови [55]. Однако эта черта, олигоклональность, присуща скорее репертуарам взрослых индивидов, при этом в пуповинной крови - разнообразие репертуара значительно выше, а частота Топ20 и V γ 9V δ 2 клонотипов значительно ниже. Высокие частоты Топ20 клонотипов, которые представляют собой по численности больше половины репертуара TRG, сохраняются на протяжении долгого времени (показано до 180 дней), то есть архитектура индивидуального репертуара относительно стабильна во времени [56].

Показано, что популяция $\gamma\delta$ Т-клеток быстро восстанавливается после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (АТГСК), хотя и с изменением репертуара, который не переходит ни от реципиента, ни от донора, то есть образуются новые мажорные клонотипы, определяющие структуру репертуара [24]. При развитии инфекции (в приведенном исследовании изучали репертуар в ответ на реактивацию CMV в пациентах после АТГСК) наблюдается экспансия клонотипов, индивидуальных для каждого пациента, которые возникают благодаря пролиферации конкретного клона, что существенно меняет распределение частот между мажорными клонотипами (Рисунок 2).

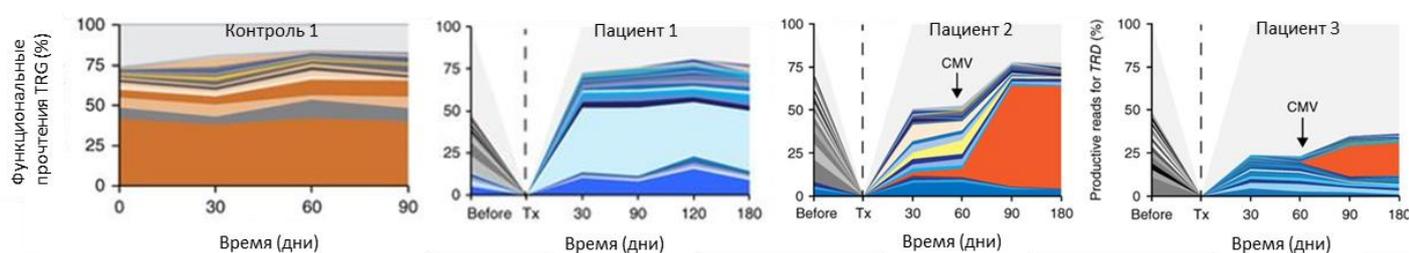


Рисунок 2. Топ 20 TRG клонов в репертуарах пациентов после АТГСК и реактивации CMV. (По Ravens et al. 2017 с изменениями)

Синими тонами обозначены $TRGV9^+$ клонотипы, оранжевыми – $TRGV9^-$. Tx – время аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (АТГСК).

В периферической крови подавляющего большинства взрослых индивидов, а также в образцах пуповинной крови, присутствует каноничный клонотип с последовательностью CDR3 региона TRG “CALWEVQELGKKIKVF”, который образуется из V9 и JP сегментов зародышевой линии без N-вставки. В разных статьях он насчитывает от 4 до 45% от всех $\gamma\delta$ Т-клеток [54,56].

TRG locus перестраивается во всех Т-лимфоцитах, однако доля TRG ридов без сдвига рамки считывания или возникновения стоп-кодона в $\alpha\beta$ Т-клетках составляет около 32%, в то время как в $\gamma\delta$ Т-клетках – около 79%, при этом репертуар $\gamma\delta$ Т-клеток по TRG более клонален, чем в $\alpha\beta$ Т-клетках [54].

Субпопуляция V γ 9V δ 2

Итак, V γ 9V δ 2 Т-клетки являются мажорной популяцией периферической крови человека и могут достигать 50-90% от всего репертуара $\gamma\delta$ Т-клеток. При этом каноническая последовательность может составлять 10-20% от всех функциональных V9-JP [57]. V γ 9V δ 2

T-клетки, в большинстве своем имеют высокую цитотоксическую активность и продуцируют большие количества $IFN\gamma$ и TNF [19], они активируются фосфоантигенами, продуцируемыми бактериями или опухолевыми клетками. Важную роль в распознавании фосфоантигенов играет молекула бутирофилина BTN3A1.

V γ 9V δ 2 T-клетки с маленьким разнообразием CDR3 регионов являются также доминантной популяцией, циркулирующей в фетальной крови человека. Более того, они обладают пре-программированными эффекторными свойствами. Таким образом, даже при развитии в стерильных условиях, фетальная человеческая кровь обогащена T-клетками, обладающими реакционной способностью в отношении патогенов, ещё до встречи с ними. V γ 9V δ 2 T-клетки из фетальной крови способны реагировать на фосфоантигены и пре-программированы для экспрессии $IFN\gamma$ и гранзимов [58].

Долгое время считалось, что популяция V γ 9V δ 2 T-клеток характерна только для приматов, однако последние данные свидетельствуют о том, что V γ 9, V δ 2 и BTN3A1 коконсервативны в различных видах плацентарных животных: приматах, альпаках, верблюдах, броненосцах, дельфинах, касатках и ленивцах, но не грызунах [58].

Известные антигены $\gamma\delta$ T-клеток

Одним из главных отличий функционирования $\gamma\delta$ T-клеток является их способность распознавать антигены вне комплекса МНС. Благодаря этому эти клетки способны распознавать широкий спектр антигенов, среди которых не только растворимые пептиды или даже белки, но и пренил пирофосфаты (фосфоантигены), фосфолипиды, сульфоллипиды, а также мембрано-связанные молекулы, в том числе МНС-подобные.

Наиболее изученными антигенами $\gamma\delta$ T-клеток являются фосфоантигены, образующиеся в результате метаболизма мевалоната. Мевалонатный метаболический путь заключается в продукции предшественников изопреноида, который, в свою очередь, необходим для биосинтеза различных молекул, в том числе холестерина (Рисунок 3. Мевалонатный метаболический путь. (по Thurnher et al. 2012) На метаболизм мевалоната влияют такие процессы как опухолевая трансформация, воспаление, клеточный стресс, что приводит к накоплению промежуточных молекул, например, IPP. Благодаря реактивности $\gamma\delta$ T-клеток на фосфоантигены, данный метаболический путь стал терапевтической мишенью в области онкологии. К тому же, при врожденной недостаточности мевалонат-киназы развивается аутоиммунная патология [59].

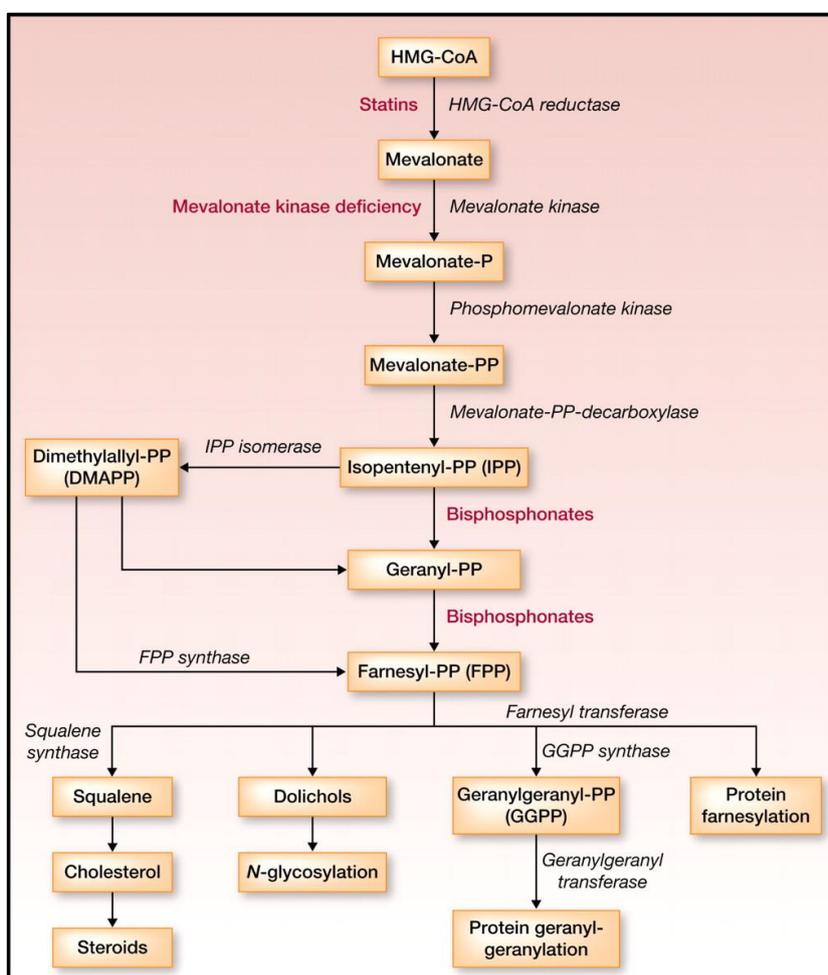


Рисунок 3. Мевалонатный метаболический путь. (по Thurnher et al. 2012)

На протяжении многих лет оставался открытым вопрос, каким образом распознаются фосфоантигены и какие молекулы в этом участвуют. Было установлено, что антитело к молекуле CD277 (относится к суперсемейству бутирофилинов) способно активировать $V\gamma9V\delta2$ T-клетки весьма схожим образом с фосфоантигенами. Молекула BTN3A1 – трансмембранная молекула с двумя иммуноглобулиноподобными внеклеточными

доменами и одним внутриклеточным доменом. Одной группой ученых было показано, что внеклеточные иммуноглобулиноподобные домены способны напрямую связывать фосфоантигены и в комплексе с ними взаимодействовать с растворимым V γ 9V δ 2 ТКР [60]. Однако эти результаты не были подтверждены другой группой ученых, которые показали, что внутриклеточный домен способен взаимодействовать с внутриклеточными фосфоантигенами, которые увеличиваются в результате инфекции или опухолевой трансформации, что изменяет конформацию молекулы BTN3A1 и именно эта измененная конформация распознается V γ 9V δ 2 ТКР [61]. На клеточной модели СНО было показано, что, вероятно, помимо BTN3A1, другие гены, расположенные на шестой хромосоме человека, также вовлечены в активацию V γ 9V δ 2 Т-клеток [62].

Среди МНС-подобных, или неклассических молекул МНС, которые распознаются $\gamma\delta$ Т-клетками, для мышинной молекулы T22 была показана кристаллическая структура в комплексе с ТКР, из которой видно, что комплекс распознается вне зависимости от презентируемого пептида [63]. Сравнительно слабая аффинность была показана при связывании ТКР молекул E-I, при котором важную роль играют посттрансляционные модификации, в частности гликозилирование, увеличивающиеся при клеточном стрессе [64]. Молекула CD1, часто экспрессирующаяся на поверхности профессиональных антиген-презентирующих клеток и способная образовывать комплекс с липидами, способна активировать субпопуляцию V δ 1 клеток. Более того, клетки, распознающие сульфатид (распространенный гликофинголипид миелина), имеют схожую последовательность CDR3 регионов TRG и TRD [65]. Лигандами для $\gamma\delta$ Т-клеток могут также являться стрессорные молекулы MICA и MICB, которые распознаются и V δ 1 ТКР, и рецептором NKG2D [66].

Разумеется, ряд бактериальных или вирусных белков также является лигандами для $\gamma\delta$ Т-клеток, среди них стафилококковый энтеротоксин, листериолизин O, микобактериальный белок ESAT-6, гликопротеин 1 вируса герпеса и др. (см. Таб. 2)

Таблица 2. Известные антигены $\gamma\delta$ T-клеток (по Pierre Vantourout and Adrian Hayday, 2014 с изменениями) [22]

Человек		
Субпопуляция	Антиген	Ссылка
V δ 1 (IEL)	MICA/B	[67]
V δ 2	ULBP4	[68]
V δ 1	CD1c	[69]
V δ 1 (кровь)	CD1d + Sulfatides	[65]
V γ 4V δ 5	EPCR	[43]
V δ 1	Lipohexapeptides	[70]
Различные	Phycoerythrin	[71]
V γ 9V δ 2	Phosphoantigens	[72]
V γ 9V δ 2	F1-ATPase	[73]
V γ 1.3V δ 2	Aminoacyl tPHK synthetases	[74]
V γ 9V δ 2	heat shock protein 60 (hsp60)	[42]
V γ 9	staphylococcal enterotoxin A	[75]
Различные	listeriolysin O	[76]
Различные	ESAT-6 protein	[77]
Мышь		
Различные	T10/T22	[78,79]
V γ 2/V δ 5 (clone)	I-E ^k	[80]
V γ 2/V δ 8 (clone)	HSV-gI	[81]
V γ 1 (clones)	Cardiolipin, Apolipoprotein H	[82]
Различные	Phycoerythrin	[71]
V γ 1	Insulin peptide	[83]

Факторы, влияющие на репертуар $\gamma\delta$ Т-клеток

Возрастные изменения иммунной системы представляют большой интерес для современной науки. Известно, что с возрастом увеличивается провоспалительный фон, развиваются хронические воспалительные заболевания и многие иммунные клетки приобретают фенотип «истощения». Общее направление в изменении состава как В-клеток, так и Т-клеток также известно: уменьшается разнообразие репертуара, истощается пул наивных лимфоцитов, которые постепенно замещаются клетками памяти. Данные изменения объясняют снижение эффективности иммунного ответа против новых инфекций. Ситуация с $\gamma\delta$ Т-клетками отлична от других лимфоцитов из-за олигоклональности репертуара взрослого индивида. Так, разнообразный репертуар зародышевой крови сразу после рождения начинает сильно изменяться, что связано с резким уменьшением $V\delta 1$ клеток и ростом $V\gamma 9V\delta 2$ популяции. Наивные $\gamma\delta$ Т-клетки, однако, демонстрируют большее разнообразие, в отличие от клеток памяти, которые преимущественно относятся к $V\gamma 9V\delta 2$. У пожилых людей наблюдается большее количество $V\gamma 2$ среди центральных клеток памяти и снижение $V\gamma 2-8$ клеток среди эффекторных клеток памяти, где преобладают $V\gamma 9$ клетки [57]. Количество $\gamma\delta$ Т-клеток в крови, также как и процент $\gamma\delta$ Т-клеток среди всех $CD3^+$ клеток, с возрастом уменьшается, в то время как количество пролиферирующих $\gamma\delta$ Т-клеток растет [84]. В другом исследовании число $V\gamma 9V\delta 2$ клеток тоже изменяется с возрастом: увеличивается с рождения до полового созревания и постепенно уменьшается после 30 лет. При этом циркулирующие $V\gamma 9V\delta 2$ клетки у женщин остаются повышенными в течение более длительного периода жизни, чем у мужчин. Резкое снижение этих клеток у мужчин сопровождается существенным истощением эффекторных Т-клеток и параллельным увеличением клеток центральной памяти, тогда как у женщин это распределение практически не изменяется. Фенотипическая конверсия у мужчин старше 30 лет отражается повышенным пролиферативным ответом $V\gamma 9V\delta 2$ клеток и уменьшенной секрецией $IFN\gamma$ при стимуляции IPP *in vitro* [85].

В заключение стоит отметить, что есть данные, свидетельствующие о том, что этническое происхождение может влиять на репертуар $\gamma\delta$ Т-клеток, а именно на частоту популяции $V\gamma 9V\delta 2$ [86,87].

Болезнь Альцгеймера и другие нейродегенеративные заболевания

В мире наблюдается рост продолжительности жизни, что ведет к значительному увеличению числа пожилых людей. Данные за 2017 год говорят о том, что в России уже

21% населения составляют люди, возраст которых более 60 лет. Опираясь на прогнозы, к 2100 году количество пожилых людей может достичь отметки в 36 миллионов человек [88]. Параллельно с ростом продолжительности жизни неизбежно растёт количество различных возрастных заболеваний, оказывающих негативное влияние на качество жизни. Неврологические нарушения, среди которых болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП), латеральный амиотрофический склероз, лобно-височная деменция, васкулярная деменция, болезнь Хантингтона и др. составляют, на данный момент, 10% от всевозможных причин «потери потенциальных лет жизни из-за преждевременной смерти или нетрудоспособности» (показатель «DALY» - “Disability-adjusted life year”). Неврологические расстройства составляют 25% от всех причин смерти пожилых людей в возрасте от 70 лет, исходя из статистических данных по всему миру за 2016 год. Известно, что наиболее распространённой причиной является инсульт (в 67,3%), БА и другие деменции составляют 20,3%, БП насчитывает 1,2% и стоит после таких заболеваний, как менингит, рак мозга, энцефалит и эпилепсия. Данные по смертности от БА и других деменций различаются по России (4,96% для людей в возрасте от 70 лет) и по Соединённым Штатам Америки (12,79%)[89]. Важно отметить, что современная медицина не имеет полной картины патогенеза и возникновения нейродегенеративных заболеваний, а также способов ее лечения, соответственно, данные патологии имеют характер медленно прогрессирующих заболеваний ЦНС[14].

Болезнь Альцгеймера является нейродегенеративным заболеванием, для которого характерно накопление нерастворимых форм белка β -амилоида, в результате чего образуются амилоидные бляшки во внеклеточном пространстве. Также происходит накопление гиперфосфорилированного тау-белка, что приводит к появлению внутриклеточных нейрофибриллярных клубков. Эти патологические изменения являются причиной повреждения нейронов и, как следствие, атрофии тканей головного мозга, что неизбежно сопровождается нарушением когнитивных функций и памяти [90]. Одним из наиболее частых и рано появляющихся симптомов БА является нарушение кратковременной памяти [91], при этом первые биохимические и даже анатомические изменения детектируются задолго до появления первых симптомов, за 15-20 лет можно зафиксировать пониженный уровень β -амилоидного пептида и увеличение концентрации тау-белка в спинномозговой жидкости, а также наблюдать начальные этапы атрофии тканей головного мозга [92].

Достаточно давно стало понятно, что БА, в некоторых случаях, имеет генетическую природу, так как появлялось всё больше описаний семейных, то есть наследственных форм. Исследование этих семей привело к выявлению ряда генов, мутации в которых приводят к развитию нейродегенеративных патологий с высокой вероятностью. Так были описаны мутации в генах APP (белок-предшественник амилоида), PSEN1 (пресенилин 1) и PSEN2 (пресенилин 2). При наличии мутаций в перечисленных генах БА проявляется рано. Наследственные формы БА, однако, описывают около 5% от всех случаев данного заболевания [5–7]. В оставшихся 95% случаев БА определить один генетический фактор, приводящий к патологии, не удастся. Однако, в различных исследованиях было показано, что факторами риска для БА могут быть другие геномные варианты, а также травмы, экология окружающей среды, перенесенные инфекции, питание и образ жизни.

ε4 аллель гена аполипопротеина Е является еще одним генетическим фактором БА, подтвержденным данными многих исследований, проведенных на выборках из популяций Европейского и Азиатского происхождения [8,9]. Риск возникновения данного нейродегенеративного заболевания для лиц пожилого возраста повышается примерно в 3 раза при условии носительства одной аллели APOE ε4 и в 8-10 раз – при условии гомозиготного состояния по указанному аллелю [93]. При анализе больших выборок также были найдены другие генетические ассоциации, обладающие низкой пенетрантностью, не подтвержденные во всех исследованиях и требующие дополнительной проверки и интерпретации. Среди них такие гены, как PICALM, CLU, SORL1, PLD3, ABCA7, CR1, TREM2, CD33 [94–97].

Вторым по частоте встречаемости диагнозом среди нейродегенеративных заболеваний является болезнь Паркинсона. Список клинических проявлений БП включает в себя: ригидность мышц, брадикинезию и тремор [98,99]. Данные нарушения обусловлены дегенерацией дофаминергических нигростриальных путей из-за накопления в нейрональных клетках цитоплазматических белков, а чаще всего, синоптического белка α-синуклеина. Данные отложения имеют название телец Леви [98,100].

Для 5-10% случаев БП известны некоторые мутации, приводящие к развитию наследственных форм, например, в генах SNCA, LRRK2, PINK1, PARK2, PARK7, VPS35. Однако остальные случаи тяжело объяснить генетическими факторами, так как имеет место более сложная этиология заболевания [101,102].

Нейродегенерация и врожденный иммунный ответ

Любые процессы нейродегенерации всегда оказываются связанными с воспалительными реакциями иммунной системы. Свидетельством этого может служить снижение лимфоцитов в крови пациентов с БА [103], отличие в концентрации различных цитокинов в сыворотке [104]. То же можно наблюдать и у пациентов с БП: отличие в уровне цитокинов (IL-2, TNF α , IL-6) от здоровых индивидов, или, например, увеличение числа $\gamma\delta$ T-клеток [105]. Генетические ассоциации с БА и БП часто находят в генах иммунной системы, при том затрагивающие разные ветви иммунной системы: CR1, CLU, TREM2 [106], ABCA7, CD33. Обычно для перечисленных генов характерна повышенная экспрессия в коре головного мозга индивидов с БА [94,95]. Для БП также были найдены генетические полиморфизмы, демонстрирующие ассоциацию с развитием заболевания. Данные полиморфизмы, например, были выявлены в генах BST1, LAMP3, а также в гене BTNL2, который относится к семейству бутирофилинов [107].

Важно отметить, что характер иммунного ответа при нейродегенерации отличается от такового в «классических» нейровоспалительных заболеваниях (например, энцефалиты различной этиологии, рассеянный склероз и др.), так как для нейродегенеративных патологий более характерно преобладание врожденного иммунного ответа, частью которого является микроглия [11,13,108].

Микроглия представляет собой популяцию резидентных макрофагов, представленных в ЦНС. Различные воспалительные сигналы, такие как лиганды Толл-подобных рецепторов, патологические белковые отложения (α -синуклеина, β -амилоида) способны активировать микроглиальные клетки, что приводит к продукции провоспалительных цитокинов (TNF, IL-1, IL-6) и хемокинов, а также образованию активных форм кислорода и усилению фагоцитоза.

Однозначно охарактеризовать вклад микроглии в патогенез нейродегенеративных заболеваний не представляется возможным. С одной стороны, β -амилоидные бляшки активируют микроглиальные клетки, которые, в свою очередь, продуцируют провоспалительные цитокины и вовлекают соседние микроглиальные клетки. Воспалительные процессы в ЦНС оказывают крайне негативное воздействие на клетки головного мозга, в конечном итоге вызывая нарушение их функций и даже гибель. Хроническое воспаление сопровождается постепенным увеличением микроглии с так называемым фенотипом «истощения», что снижает их способность фагоцитировать и приводит к другим нарушениям функционирования [13]. С другой стороны, микроглия

является фагоцитами ЦНС и помогает устранять клеточный дебрис, а также токсические белковые отложения. Более того, в нормальных условиях, микроглия вносит вклад и в процессы репарации. Также микроглиальные клетки, скапливаясь вокруг амилоидной бляшки, образуют механический барьер, экранирующий нейроны от токсического воздействия нерастворимых пептидов [109]. Полиморфизмы, ассоциированные с рисками БА, которые описывались выше, часто экспрессируются именно в клетках микроглии в процессе активации, например, TREM2 или фосфолипаза C γ 2 [110]. В случае инфекции микроглия также способна презентировать антигены в составе комплекса МНСII [111].

Важную роль микроглия играет и в патогенезе БП, что связано, опять же, с ее чрезмерной активацией [112]. Было показано, что α -синуклеин может активировать микроглиальные клетки с помощью рецептора TLR. Как и в случае БА, микроглия часто образует скопления вокруг белковых отложений. Воспалительные цитокины, продуцируемые микроглией - IL-1b и TNF α , IL-6. По всей видимости, разгорающееся в ткани головного мозга воспаление является главным фактором клеточной гибели в процессе нейродегенерации. При этом на ранних этапах, как и в случае с БА, микроглия может играть протективную роль, фагоцитируя токсические отложения [112,113].

Нейродегенерация и адаптивный иммунитет

Несмотря на тот факт, что именно врожденный иммунитет признан основным участником нейроиммунологических процессов в контексте нейродегенеративных заболеваний [11,13,108], существует некоторое количество данных, свидетельствующих об участии адаптивного иммунитета в развитии патологии. Например, для целого ряда нейродегенеративных заболеваний были найдены генетические ассоциации в структурных и регуляторных областях генов HLAII, а также других генах, участвующих в презентации антигена[14]. Среди них ген TAP2 (rs241448), ассоциированный с риском развития БА у носителей APOE ϵ 4 аллеля [114].

Существуют и менее косвенные данные о причастности адаптивного иммунитета к развитию нейродегенерации: повышенная реактивность к β -амилоиду Т-клеток из периферической крови индивидов с БА, повышенный титр аутоантител к β -амилоидному пептиду у больных по сравнению со здоровыми [104][115,116]. Интересно, что исследование трансгенных (5xAD) мышей в отсутствие Т-, В- и NK- клеток (RAG-фенотип) помогло доказать необходимость антител для эффективного фагоцитоза β -амилоида клетками микроглии [117]. Это демонстрирует, что адаптивный иммунитет в

определенных условиях может благоприятно влиять на патогенез нейродегенеративных заболеваний [12].

С другой стороны, провоспалительные лимфоциты с фенотипом TH1 и TH17 могут инфильтрировать ткань головного мозга из-за цитокинов, которые продуцирует микроглия, и продуцировать, в свою очередь, IFN γ и другие провоспалительные цитокины, тем самым усиливая воспаление в ЦНС. [118]. Действительно, в постмортальных образцах головного мозга больных БП были обнаружены CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки. При этом (по данным исследования мышинной модели БП) CD4⁺ клетки вызывают клеточную гибель дофаминергических нейронов через FAS-FASL взаимодействие [119].

Для многих нейродегенеративных заболеваний характерно нарушение проницаемости гематоэнцефалического барьера, что, естественно, сопровождается измененным транспортом веществ, а также способствует проникновению иммунных клеток из периферической крови в ткани головного мозга [120].

$\gamma\delta$ Т-клетки при различных заболеваниях центральной нервной системы

$\gamma\delta$ Т-клетки наделены смежными функциями врожденной и адаптивной иммунных систем, что позволяет им, с одной стороны, быстро реагировать в случае инвазии патогена, с другой стороны, вырабатывать более специфичный иммунный ответ на различные, в том числе не белковые антигены. Таким образом, $\gamma\delta$ Т-клеточный ответ является не только важным звеном в противовирусной или антибактериальной защите ЦНС, но и вносит свой вклад в другие различные патологические процессы, происходящие в головном мозге в результате инсульта, психиатрических расстройств и травм. Однако механизмы остаются слабо изученными и требуют дальнейших исследований. Далее речь пойдет об отдельных исследованиях, посвященных $\gamma\delta$ Т-клеткам в контексте нейроиммунологии.

В первую очередь, следует отметить, что активированные клетки микроглии, которые являются главными резидентными иммунными клетками в ЦНС, способны поляризовать и индуцировать цитотоксический эффект $\gamma\delta$ Т-клеток в отношении нейронов *in-vitro*. При этом сигналами для активации самой микроглии могут служить лиганды Toll-подобных рецепторов (TLR2, TLR4, TLR7, или TLR9), после стимуляции которыми микроглия экспрессирует IL-1 β и IL-23, которые приводят к тому, что $\gamma\delta$ Т-клетки начинают продуцировать большое количество IL-17 и вызывать гибель нейронов через клеточный контакт [121].

На примере $\gamma\delta$ T-клеточного ответа на вирус Лихорадки Западного Нила можно заключить, что различные популяции $\gamma\delta$ T-клеток могут оказывать противоположное действие на патогенез инфекционного заболевания ЦНС. Так, в зависимости от того, какая из субпопуляций V γ 1 или V γ 4 $\gamma\delta$ T-клеток мыши превалирует в очаге инфекции, зависит течение заболевания. В ответ на инфекцию у молодых мышей наблюдается резкое увеличение V γ 1 клеток, а у старых V γ 4 клеток. V γ 1 продуцируют большое количество IFN γ , который способствует снижению титра вирусных частиц и снижает смертность от энцефалита. V γ 4 клетки имеют большую склонность к продукции TNF- α , который, вероятно, увеличивает проницаемость ГЭБ для вирусных частиц и, как следствие, увеличивают смертность [122].

Ишемический инсульт – еще одно заболевание, для которого показано присутствие $\gamma\delta$ T-клеток непосредственно вблизи очага поражения. После ишемии головного мозга в лептоменингеальных оболочках накапливаются IL17+ $\gamma\delta$ T-клетки. Интересно, что они способны мигрировать в мозговые оболочки из кишечника. Более того, применение антибиотиков для уничтожения микрофлоры кишечника снижает степень поражения мозга после ишемического инсульта, благодаря увеличению в кишечнике T-регуляторных клеток, продуцирующих IL10, благодаря которому уменьшается миграция IL17+ $\gamma\delta$ T-клеток в мозговые оболочки [123].

При энцефалите Расмуссена наблюдается клональная экспансия $\gamma\delta$ T-клеток в ткани головного мозга. $\alpha\beta$ T-клетки также присутствуют в очаге поражения и представляют собой преимущественно CD8+ лимфоциты, однако соотношение $\alpha\beta/\gamma\delta$ сильно смещается в сторону $\gamma\delta$ T-клеток в тканях головного мозга относительно периферической крови. Клоны, обнаруживаемые в большинстве образцов тканей пациентов с энцефалитом Расмуссена, принадлежат V δ 1 популяции [124].

В исследовании роли $\gamma\delta$ T-клеток в патогенезе «классического» аутоиммунного заболевания - рассеянного склероза, при котором развивается адаптивный иммунный ответ на белки миелиновых оболочек, данные нередко противоречат друг другу. Это объясняется различными субпопуляциями $\gamma\delta$ T-клеток, которые выполняют разные функции в нейровоспалительном процессе. Как и в случае с исследованием реакции на вирус Лихорадки Западного Нила, было выявлено, что мышинные V γ 1 и V γ 4 клетки имеют различные профили цитокинов. V γ 4 клетки продуцируют различные провоспалительные цитокины, включая IL17. V γ 1 клетки продуцируют лиганды CCR5, что может способствовать дифференцировке регуляторных T-клеток, то есть обладают протекторным

действием [125]. Потенциальным антигеном для $\gamma\delta$ T-клеток в очагах демиелинизации могут быть белки теплового шока hsp65 и hsp70, увеличивающиеся на поверхности олигодендроцитов в результате клеточного стресса [126,127], однако это предположение было сделано более чем 20 лет назад и до сих пор не подтверждено современными исследованиями. Другой вероятный антиген, распознаваемый $\gamma\delta$ T-клетками больных рассеянным склерозом, это сульфатид в составе молекулы CD1. Примечательно, что клетки, специфичные для данного антигена, относятся к субпопуляции V δ 1, а распознавание происходит именно сульфатид-специфично, то есть наличие презентруемого антигена, в данном случае, является определяющим [65].

Синдром Гийена-Барре еще одно острое демиелинизирующее заболевание аутоиммунной природы. Для него также были выявлены V γ 8/ δ 1 $\gamma\delta$ T-клетки в очагах поражения, при этом в периферической крови V γ 9/ δ 2 субпопуляция оставалась мажорной. Любопытно, что появлению синдрома Гийена-Барре часто предшествует кишечная инфекция, вызванная *Campylobacter jejuni*, что может косвенно свидетельствовать о связи резидентных $\gamma\delta$ T-клеток кишечника с $\gamma\delta$ T-клетками, инфильтрирующими нервную систему [128].

Есть небольшое, на данный момент, количество данных, свидетельствующих о том, что $\gamma\delta$ T-клетки каким-то образом вовлечены в процессы, характерные для церебрального паралича [129] или шизофрении [130], однако эти данные требуют дальнейшего уточнения.

В нашей работе по изучению эпигенетических профилей H3K4me3 (маркированное состояние хроматина, показывающее экспрессию генов) нейронов префронтальной коры индивидов с диагнозом шизофрения было показано, что, по крайней мере, 651 (51%) ген из списка, включающего 1289 известных иммунных генов, находится в метилированном состоянии по 4 лизину [131]. Среди активно экспрессирующихся в нейронах генов есть, в том числе, мембранные рецепторы к иммунным растворимым факторам (CCR10 CCR7, CSF1R, CX3CR1, CXCR4, IFNAR1, IFNAR2, IFNGR1, IFNGR2, IL10RA, IL10RB, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RD, IL18R1, IL1R1, IL1RAP, IL1RL2, IL20RA, IL27RA, IL4R, IL5RA, IL6R, LTB4R, LTB4R2, PTGDR, PTGER1, PTGER2, PTGER3, PTGER4, PTGFR, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10D, TNFRSF11A, TNFRSF12A, TNFRSF13C, TNFRSF14, TNFRSF18, TNFRSF19, TNFRSF1A, TNFRSF21, TNFRSF4, TNFRSF6B, TNFRSF9), следовательно, небольшое количество иммунных клеток в менингеальных оболочках, пристеночном пространстве сосудов, спинномозговой жидкости или тканях головного мозга, продуцирующих сигнальные молекулы, способны влиять на функционирование нейронов в ЦНС.

Материалы и методы

МАТЕРИАЛЫ

Биологические образцы

Коллекции образцов крови

Биологические образцы периферической крови пациентов с диагностированной болезнью Альцгеймера или Паркинсона, а также здоровых индивидов собирались с помощью вакуумной системы забора крови в контейнер, содержащий ЭДТА. Все доноры или лица, представляющие их интересы, предварительно подписывали информированное согласие. Коллекции крови, собранные таким образом, хранились при -80°C , ДНК, выделенная из крови, хранилась при -20°C .

Коллекции образцов тканей головного мозга

Образцы тканей лобной и височной долей коры головного мозга были получены из банков тканей США: Нью-Йоркский банк мозга [132], Орегонский банк тканей [133], банк тканей Университета Дьюк [134]. Образцы хранились при -80°C и не размораживались при проведении любых манипуляций.

Расходные материалы

В ходе работы были использованы одноразовые расходные материалы, такие как перчатки нитриловые «SOFT NITRILE», пробирки на 200, 500 мкл «Axigen», пробирки на 1.5, 2 мл и «low bind» производства «Eppendorf», пробирки центрифужные на 15 и 50 мл «Falcon». Автоматические пипетки и настольная центрифуга «Eppendorf», одноразовые наконечники для автоматических пипеток на 1-10, 10-100, 20-200, 100-1000 мкл производителей «Eppendorf» и «Axigen».

МЕТОДЫ

Методы работы с нуклеиновыми кислотами

Выделение ДНК

ДНК из клеток, крови и тканей выделялось набором QIAGEN «DNeasy Кровь & Tissue Kit». По сравнению со стандартным протоколом производителя, был изменен режим центрифугирования на стадиях связывания с колонками и элюции. Вместо 1 мин при скорости больше $10000\times G$, выполнялось центрифугирование в три шага: 1 мин при 800gpm , 1 мин при 1200gpm , 2 мин при 13000gpm . Для элюции использовался буфер EB или AE, нагретый до 56°C . Три элюции собирались в отдельные пробирки.

Часть более ранних образцов крови, вошедших в коллекцию до начала выполнения данной работы, были выделены не колоночным методом, а с помощью фенола по стандартному протоколу [135].

Качество и количество выделенной ДНК определялось прибором NanoDrop для менее чувствительных протоколов, как ПЦР. Для более чувствительных методов (приготовление библиотек, секвенирование) использовался флуорометр Qbit «Invitrogen» и реактивы Qubit dsДНК BR Assay Kit и Qubit dsДНК HS Assay Kit – «Thermo Fisher Scientific».

Выделение РНК

РНК выделялась с помощью набора QIAGEN «RNeasy Kit» в соответствии со стандартным протоколом производителя. В буфер RLT добавлялся β-меркаптоэтанол в рекомендованной пропорции, для гомогенизации тканей использовался механический погружной гомогенизатор «VWR». На стадии элюции вместо 1 мин при скорости больше 10000xG, выполнялось центрифугирование в три шага: 1 мин при 800rpm, 1 мин при 1200rpm, 2 мин при 13000rpm, что увеличивает итоговую концентрацию РНК.

Качество и количество выделенной РНК определялось прибором NanoDrop.

Проведение реакции обратной транскрипции

Для обратной транскрипции использовалась 1мкг РНК, реакция проводилась с помощью набора реагентов SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR «Invitrogen» в соответствии с протоколом производителя. В качестве праймеров использовались рандомные олигонуклеотиды, входящие в состав набора. Для каждой группы образцов ставился положительный и отрицательный контроль. Весь объем реакционной смеси после завершения протокола для обратной транскрипции использовался для проведения мультиплексного ПЦР или ПЦР в реальном времени.

Полимеразная цепная реакция

Для проведения ПЦР, продукты которого не использовались для глубокого секвенирования, применялись реагенты «Isogene». В других случаях использовалась PicoMaxx High Fidelity PCR System «Agilent». Для проведения реакции использовался амплификатор GENEAMP 9700 «Applied Biosystems», синтез олигонуклеотидов был произведен компаниями «Евроген» или «Integrated ДНК Technologies». Температура отжига выставлялась согласно результатам программы «Primer3» [136], на первой стадии образец инкубировали при 95°С 5 мин, затем проводились следующие 35 циклов: при 94°С в течение 30 сек, при температуре отжига – 30 сек, при 72°С – 45 сек, на заключительном этапе

инкубировали при 72°C в течение 10 мин, остужали в амплификаторе до 4°C и анализировали методом электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле не подвергая продукты амплификации заморозке.

ПЦР в реальном времени

ПЦР в реальном времени проводили на приборе Applied Biosystems 7500 FAST или 7500 с использованием КАРА SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2X). В качестве референсного красителя использовался 5-карбоксих-родамин (ROX). Объем реакции составлял 20 мкл. В качестве генов домашнего хозяйства были выбраны гены ALB

(5'-TGAACAGGCGACCATGCTT-3' и 5'-CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT-3'), если в качестве матрицы использовалась геномная ДНК, UBC

(5'-CGGCCTTAGAACCCAGTAT-3' и 5'-TCACGAAGATCTGCATTGTCA-3') –

если в качестве матрицы использовалась кДНК. Программа амплификации была следующей: 50°C – 1 мин, 95°C – 3 мин, далее 40 циклов, состоящих из чередования 95°C 5 сек, 60°C – 45 сек.

Метод электрофореза нуклеиновых кислот

Электрофорез в агарозном или полиакриламидном геле проводился по стандартному протоколу. 2% агарозный гель или 8% ПААГ готовились на буфере TBE. Использовались, соответственно, камера для проведения горизонтального электрофореза SE-2, камера для вертикального фореза VE-20 и источник тока эльф 4. Для более эффективного разделения в 8% ПААГ проводился префорез в течение 30 минут при напряжении 45 В/см, сам электрофорез проводили при 240В в течение 3-4 часов, после чего гель вынимали из камеры, отделяли от стекол и инкубировали в течение 15 минут в TBE с добавлением бромистого этидия.

Методы получения репертуаров CDR3 регионов TRG человека

Мультиплексная полимеразная цепная реакция

Метод мультиплексной ПЦР основывался на опубликованных олигонуклеотидах, разработанных консорциумом BIOMED2 [52]. На один образец ставилось две реакции с различными олигонуклеотидами, комплементарными V сегментам: Vf/V10 и V9/V1, все олигонуклеотиды, комплементарные J-сегментам, добавлялись в каждую реакцию. На одну реакцию использовалось 200нг матрицы, каждая реакция ставилась в двух повторностях. При использовании геномной ДНК в качестве матрицы олигонуклеотиды для амплификации участка гена ALB добавлялись в микс Vf/V10, в случае использования кДНК

олигонуклеотиды для амплификации участка гена UBC– ставились в отдельных пробирках. Для амплификации CDR3 регионов TRG человека использовались олигонуклеотиды: TCGVf-5'-GGAAGGCCCCACAGCRTCTT-3', TCGV10-5'-AGCATGGGTAAGACAAGCAA-3', TCGV9-5'-CGGCACTGTCAGAAAGGAATC-3', TCGV11-5'-CTTCCACTTCCACTTTGAAA-3', TCRGJ1.1/2.1-5'-TTACCAGGCGAAGTTACTATGAGC-3', TCRG-J1.3/2.3-5'-GTGTTGTTCCACTGCCAAAGAG-3', TCRGJP-5'-CTGTAATGATAAGCTTTGTTCCGG-3', для амплификации внутренних контролей использовались олигонуклеотиды: ALB-5'-TGAACAGGCGACCATGCTT-3', ALBrev-5'-CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT-3', UBC-5'-CGGCCTTAGAACCCAGTAT-3', UBCrev-5'-TCACGAAGATCTGCATTGTCA-3'

Состав одной реакционной смеси включал в себя: буфер Picomaxx 10x, dNTP 100nM 0,16 мкл, олигонуклеотиды 100nM 0.5 мкл (V9/V11), 0.516 мкл (Vf/V10), полимеразу Picomaxx 0.5 мкл. DEPC водой объем довели до 20 мкл. Условия проведения ПЦР TRG заключались в инкубации при 95°C – 2 мин, далее следовало 35 циклов чередования стадий 95°C – 40 сек, 60 °C – 30 сек, 72 °C – 40 сек, на заключительном этапе проводилась инкубация при 72°C в течение 10 мин с последующим снижением температуры до 4°C. Для отдельной реакции амплификации гена домашнего хозяйства UBC – реакция ставилась в 10 мкл. В состав реакционной смеси вошли: буфер Picomaxx 10x, dNTP 100nM 0,08 мкл, олигонуклеотиды 100nM 0.1 мкл, полимеразы Picomaxx 0.25 мкл, DEPC вода, 0.5 мкл кДНК. Условия проведения ПЦР для гена UBC были такими же, как и для TRG.



Рисунок 4 Схема расположения олигонуклеотидов для амплификации CDR3 регионов TRG. V – TRGV-сегмент, J – TRGJ-сегмент, N – N-вставка нематричных нуклеотидов.

Очистка продуктов полимеразной цепной реакции

После проверки эффективности ПЦР методом электрофореза в 2% агарозном геле, реакции, содержащие продукты амплификации, смешивались в равной по объему пропорции. В

случае, если присутствовала реакция с амплифицированным геном UBC, ее добавляли объемом 1 мкл. Полученную смесь очищали на колонках QIAGEN MinElute PCR Purification Kit. По сравнению со стандартным протоколом производителя, был изменен режим центрифугирования на стадиях связывания с колонками и элюции. Вместо 1 мин при скорости больше 10000xG, выполнялось центрифугирование в три шага: 1 мин при 800rpm, 1 мин при 1200rpm, 2 мин при 13000rpm. Для элюции использовались 30 мкл буфера EB, нагретый до 56°C.

Приготовление библиотек для глубокого секвенирования

Приготовление библиотек для глубокого секвенирования осуществлялось с помощью набора реактивов TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit «Illumina». Большей частью, протокол соответствовал протоколу производителя за исключением отдельных деталей и способов очистки. Для приготовления библиотеки с геномной ДНК использовалось 400 нг ПЦР-продукта в 30 мкл буфера EB на одну библиотеку, для приготовления библиотеки с кДНК использовалось 100нг. К 30 мкл ПЦР-продукта добавляли 20 мкл ERM (End repair mix), смешивали пипетированием, инкубировали в течение 30 мин при 30°C. По прошествии времени переносили пробирки в лед. Очищали ПЦР-продукты на колонке Minelute QIAGEN по протоколу, описанному в предыдущем разделе. Элюировали в буфере RSB объемом 10мкл. Элюат использовали повторно для второй элюции, что позволяло повысить выход ДНК. Переносили 8.75 мкл элюата в новую пробирку и добавляли 6.25 мкл ATL (A-tailing mix), перемешивали пипетированием и инкубировали при 37°C 30 мин, потом при 70°C 5 мин. Переносили в лед и инкубировали 5 мин. После чего для лигирования адаптеров добавляли 1.25 мкл буфера RSB, 1.25 мкл LIG2 (лигаза) и 1.25 мкл адаптеров (Truseq dual index adapters или Unique dual index adapters), перемешивали пипетированием и инкубировали при 30°C 10 мин, после чего переносили в лед и добавляли 2.5 мкл STOP буфера, перемешивали пипетированием и очищали на колонке Minelute QIAGEN по протоколу, описанному в предыдущем разделе, элюировали в 22 мкл за два раунда нанесения и центрифугирования. Полученные библиотеки наносили на 2% E-гель «Invitrogen», разгоняли продукты в течение 7 мин и вырезали фрагмент геля, содержащий продукты длиной 220 до 1200 пн. Очищали с помощью набора реагентов QIAquick Gel Extraction Kit QIAGEN по протоколу, описанному в предыдущем разделе, элюировали в 22 мкл за два раунда нанесения и центрифугирования.

Глубокое секвенирование приготовленных библиотек

Молярность приготовленных библиотек, зависящая, в первую очередь, от эффективности лигирования адаптеров, оценивалась методом ПЦР в реальном времени для каждой

библиотеки с использованием KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix, праймеров KAPA, комплементарных адаптеров «Illumina», и стандартов для построения калибровочной кривой. ПЦР проводилась согласно протоколу производителя. Библиотеки пулировали в эквимольном соотношении и повторно определяли молярность получившегося пула методом количественного ПЦР в реальном времени. К каждому запуску добавляли около 10% Phix «Illumina». Далее библиотеки секвенировали на приборе MiSeq Illumina.

Методы иммуногистохимии

Приготовление препаратов

Образцы тканей головного мозга оставляли при -20°C на 15 мин. После чего погружали в ОСТ и с использованием криотома делали серию срезов толщиной 10-12 мкм в зависимости от хрупкости ткани. Полученные препараты высушивали на воздухе и фиксировали в холодном PFA 4% в течение 15 мин при комнатной температуре. После чего отмывали 5 мин в растворе TritonX100 0.05% в холодном PBS. Далее отмывали в чистом холодном PBS в течение 5 минут. После удаления лишней жидкости инкубировали в TrueBlack («Lipofuscin Autofluorescence Quencher» - гаситель аутофлуоресценции липофусцина), разведённом 1:20 в 70% этаноле, в течение 1 мин. Далее отмывали 5 мин в холодном PBS.

Окраска препаратов и флуоресцентная микроскопия

Для забивки использовали Normal serum block «Biolegend», инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Инкубировали с первичными антителами, разведёнными 1:100 в NSB в течение 3 часов при 4°C, а потом 30 мин при комнатной температуре. Отмывали холодным PBS три раза по 5 мин. Инкубировали со вторичными антителами, разведёнными 1:1000 в NSB в течение 1 часа при комнатной температуре. Отмывали 3 раза по 5 мин холодным PBS. Полностью высушивали и покрывали маунтингом ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI «ThermoFisher Scientific».

Антитела, использованные для окраски срезов коры головного мозга человека: поликлональные кроличьи Anti-CD3, Affinity isolated, «DAKO»; Anti-TCRgamma/delta моноклональные антитела (5A6.E9) мышьиные IgG1 «ThermoFisher»; Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed вторичные антитела конъюгированные с Alexa Fluor 488 «ThermoFisher»; Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed вторичные антитела конъюгированные с Alexa Fluor 568 «ThermoFisher»; Очищенные мышьиные IgG1, к Isotype Ctrl антитела «Biolegend»; Очищенные кроличьи поликлональные Isotype Ctrl антитела «Biolegend».

Окрашенные препараты анализировались методом конфокальной микроскопии на следующий день после окраски.

Методы биоинформатического анализа

Данные репертуаров CDR3 $\gamma\delta$ T-клеточных рецепторов были получены из данных исходных прочтений с помощью программы MiXCR, версии v2.1.5 (со значениями параметров по умолчанию) [137].

Корректировка, деконтаминация полученных репертуаров и фильтрация нефункциональных клонотипов были выполнены с помощью программы VDJtools, версии v1.1.9 (со значениями параметров по умолчанию) [138]. Дополнительно были удалены клонотипы с длиной CDR3 регионов более 27 аминокислотных остатков как потенциальные редкие ошибки амплификации.

Базовые статистики по пред-обработанным репертуарам (средняя длина последовательности CDR3, среднее число нуклеотидов, которые находятся между V и J сегментами, конвергентность, анализ разнообразия (нормализация репертуаров на количество прочтений (50 000), расчет нормализованного индекса Шеннона-Винера, D50) и анализ пересечений репертуаров (расчет попарных коэффициентов Жаккара с последующей визуализацией кластеров) были также выполнены с использованием программы VDJtools v1.1.9.

Дальнейшая обработка и визуализация данных была выполнена с помощью собственных Python 3 алгоритмов с использованием библиотек pandas для обработки табличных данных, seaborn и matplotlib для построения диаграмм, scipy для статистического анализа.

Методы статистического анализа

Для оценки нормальности распределения данных был использован критерий Шапиро-Уилка. Нормально распределенные свойства репертуаров от разных образцов сравнивались с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента (для случаев с неравной дисперсией), для сравнения свойств, распределенных ненормально использовали U-критерий Манна-Уитни. Для сравнения свойств репертуаров, полученных от одного и того же донора (например, репертуары из лобной и височной доли одного индивида), использовали t-критерий Стьюдента для зависимых выборок в случае нормального распределения данных или критерий Уилкоксона для непараметрических данных. Множественные групповые сравнения проводили с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) или

критерия Краскела-Уоллиса с апостериорным специальным тестом Данна. Поправка на множественное тестирование учитывалась методом Холма-Бонферрони.

Корреляционный анализ проводился методами Пирсона или Спирмана для параметрических и непараметрических данных, соответственно.

Кластерный анализ репертуаров с учетом физико-химических свойств проводился с помощью апостериорного пермутационного теста (р-значения указаны для $n=10000$ пермутаций).

Результаты и Обсуждения

Оптимизация метода получения репертуаров TRG человека

Состав репертуаров CDR3 регионов TRG анализировался не только качественно (последовательности найденных клонотипов), но и полуколичественно (относительные частоты клонотипов). Известно, что процессы амплификации могут вносить погрешность из-за разной эффективности отжига праймеров. В то же время из-за лимитированного количества матрицы наиболее удачным способом амплификации перестроек генов иммуноглобулинов является применение технологии мультиплексной ПЦР и подбор вырожденных олигонуклеотидов, комплементарных сразу нескольким близкородственным сегментам. Консорциум BIOMED2 разработал набор олигонуклеотидов для равномерной амплификации большинства генов иммуноглобулинов для использования в диагностике лимфопролиферативных заболеваний [52]. Однако в контексте получения репертуаров $\gamma\delta$ T-клеток с помощью глубокого секвенирования предложенные олигонуклеотиды для амплификации перестроенных TRG локусов являлись неоптимальными, так как среди них отсутствовал праймер для TRGJP сегмента по причине распространенного публичного клона TRGV9-TRGJP, который может давать ложно положительный пик при фрагментном анализе ПЦР смеси. Таким образом, нами был разработан олигонуклеотид, комплементарный TRGJP сегменту, для добавления в обе реакционные смеси в эквимольном соотношении с другими олигонуклеотидами. Также были добавлены олигонуклеотиды к гену домашнего хозяйства *ALB* в соотношении 1:6 относительно пары праймеров TRGV и TRGJ для дополнительной оценки качества ДНК, использованной в качестве первоначальной матрицы. Концентрацию данных олигонуклеотидов подобрали методом перебора соотношений 1:1, 1:3, 1:6, 1:10, эффективность ПЦР проверяли методом электрофореза в 8% ПААГ (Рисунок 5) и методом Taqman PCR. Было выявлено, что добавление олигонуклеотидов к *ALB* влияет на процессы амплификации в составе смеси V9/V11, но не Vf/V10, что определило выбор реакционной смеси для добавления контрольных олигонуклеотидов. Далее были подобраны условия ПЦР: полимеразы - PICOMAXX High Fidelity System (Agilent), объем реакции - 2x20 мкл, концентрация ионов магния, количество циклов для получения необходимого количества ПЦР продукта для последующего создания библиотеки - 35.

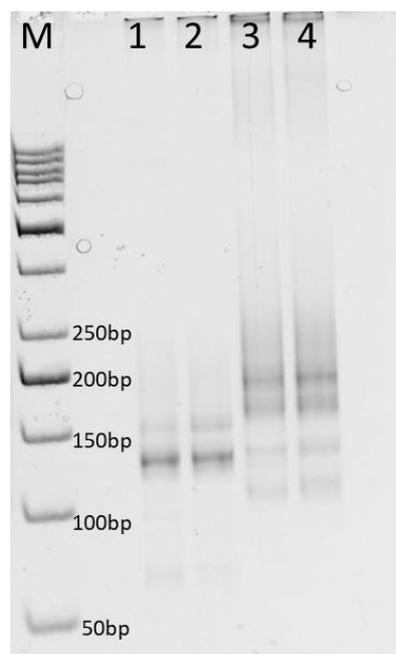


Рисунок 5. Проверка эффективности ПЦР после добавления праймеров к TRGJP сегменту и контрольному гену ALB методом электрофореза в ПААГ 8%. Продукты ПЦР реакции с использованием следующих олигонуклеотидов: 1. V9/V11 (BIOMED) 2. V9/V11 + JP 3. Vf/V10 (BIOMED) 4. Vf/V10 + JP + ALB (в соотношении 1:6). М – дорожка с маркером 50bp.

Оценка воспроизводимости получаемых результатов.

Чтобы оценить, не вносит ли процесс амплификации серьезных случайных ошибок в частоты клонотипов, два образца ДНК из периферической крови (NL3 и A846) были использованы для приготовления репертуаров TRG в независимых экспериментальных повторностях. В результате анализа полученных репертуаров была показана высокая степень воспроизводимости получаемых данных (Рисунок 6Б-В). Сходство репертуаров оценивалось с помощью индекса Мориситы-Хорна, при этом анализировали только функциональные перестройки. Значение индекса для обеих пар образцов составило 0,95.

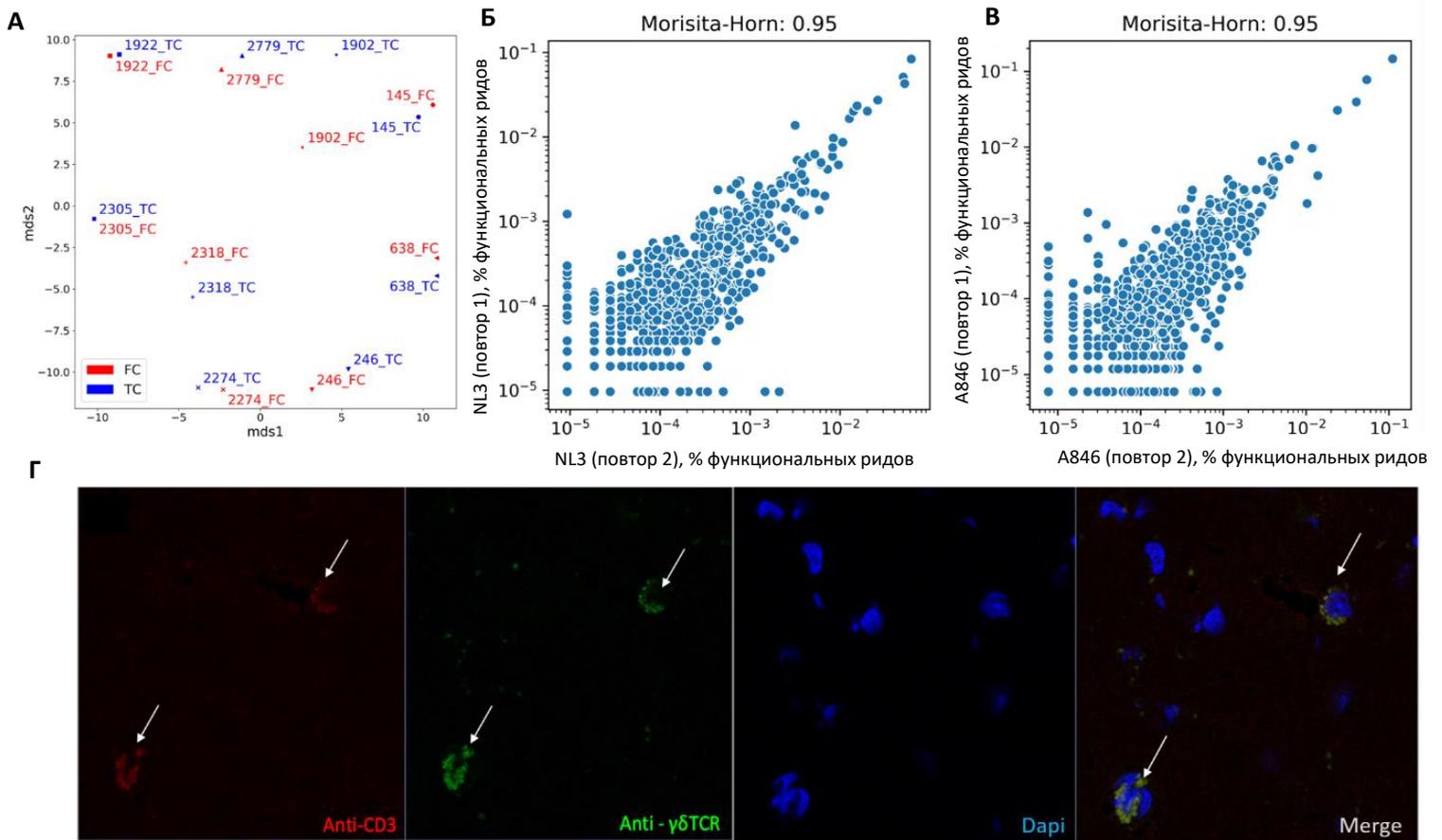


Рисунок 6 Верификация метода получения TRG репертуаров человека и результаты конфокальной микроскопии образцов головного мозга человека. Многомерное шкалирование с использованием коэффициентов Жаккара показало, что репертуары TRG из лобной и височной коры головного мозга одного и того же индивида кластеризуются вместе (А). Две независимые повторности репертуаров периферической крови доноров NL3 (Норма) и A846 (БА) демонстрируют высокую степень воспроизводимости частот клонотипов (Б, В). Результаты конфокальной микроскопии подтвердили наличие γ T-клеток, двойных положительных по CD3 и гамма цепи ТКР, в срезах головного мозга человека (Г). FC-лобная доля, TC-височная доля

При анализе репертуаров, полученных из ткани коры головного мозга встает проблема, связанная с лимитированными количествами матрицы в выделенном образце ДНК или РНК. Так как в анализе участвуют последовательности CDR3 регионов, которые соответствуют сравнительно небольшому числу Т-клеток (относительно изначального полного репертуара), можно предположить, что репертуары, полученные из одного и того же образца и тем более из образцов разных долей головного мозга одного индивида, будут сильно отличаться. Однако индекс Мориситы-Хорна для двух репертуаров, независимо полученных из ДНК, выделенной из коры головного мозга образца 246, был равен 0.84. А

при кластеризации по Жаккару парных репертуаров, полученных из лобных и височных участков коры головного мозга от одних и тех же пациентов, наблюдается близкое расположение репертуаров внутри одного донора по сравнению с другими донорами, что свидетельствует об относительной однородности репертуара в различных областях коры головного мозга, а также о воспроизводимости метода в контексте образцов головного мозга (Рисунок 6А). Однако также следует принять во внимание, что в связи с малочисленностью клонов в тканях головного мозга, может возникать проблема гиперамплификации репертуаров. Во избежание связанных с этим ошибок, целесообразно переходить к сравнению Топ 20 клонов или подсчету невзвешенных на частоты параметров.

Для подтверждения непосредственного присутствия Т-лимфоцитов в анализируемых тканях головного мозга человека была проведена иммунофлуоресцентная визуализация клеток методом конфокальной микроскопии на образцах с минимальным постмортальным временем перед заморозкой образца. Для окраски были использованы конъюгированные с флуорохромами антитела к CD3 и гамма-дельта Т-клеточному рецептору. Так как большинство образцов принадлежало людям пожилого возраста, в тканях головного мозга детектировались многочисленные очаги накопления липофусцина, который обладает автофлуоресценцией как в красном, так и в зеленом спектре. Поэтому для анализа методом конфокальной микроскопии был использован гаситель липофусцина. Для каждого снимка применялась технология усреднения сигнала по четырем сканированиям, что значительно снижало фон и позволяло распознать слабый сигнал. Для проверки эффективности антител окрашивался соскоб букального эпителия, зафиксированный на предметном стекле в PFA 4%. Далее протокол полностью соответствовал описанному в материалах и методах. Были проанализированы 6 образцов, из которых 3 от здоровых доноров и 3 от пациентов с болезнью Альцгеймера. Расположение обнаруженных клеток носит диффузный характер. На срезах головного мозга были обнаружены отдельно лежащие Т-лимфоциты (положительные по CD3), часть из которых была гамма-дельта Т-лимфоцитами (Положительные по CD3 и $\gamma\delta$ TCR) (Рисунок 6Г), однако из-за того что при заморозке образцов в банках тканей не были использованы криопротекторы, структура ткани сильно нарушена и проанализировать месторасположение данных клеток, а так же их соотношение не представлялось возможным.

Дополнительно проверяли специфичность разработанного метода мультиплексной ПЦР, исключая нейрональное происхождение ПЦР-продуктов, содержащих CDR3 регионы TRG. Для этого была использована ДНК, выделенная из сортированных ядер нейронов (по Gusev et. al 2019). Коротко, замороженный участок коры головного мозга гомогенизировали

ручным стеклянным гомогенизатором в ледяном лизирующем буфере, ядра отделяли с помощью ультрацентрифугирования в сахарозе, далее проводили гибридизацию с флуоресцентно мечеными антителами к NeuN, после чего на клеточном сортире отбирали положительные ядра и замораживали. Выделенную ДНК использовали в качестве матрицы для проведения ПЦР. Как и предполагалось, ПЦР продукты обнаруживаются только в образцах, где использовали тотальную фракцию ДНК из коры головного мозга или периферической крови, но не ДНК из ядер нейронов.

Анализ репертуаров CDR3 регионов TRG Человека

Оценка выборки анализируемых образцов

В данной работе представлены результаты анализа 165 репертуаров CDR3 регионов TRG от 141 индивида (Приложение 1). Среди них 62 образца от пациентов с диагностированной болезнью Альцгеймера, 16 – от пациентов с болезнью Паркинсона, 87 – от пациентов из контрольной группы. Соотношение полученных репертуаров от женщин и мужчин составило 87:77. Репертуары из периферической крови составили 81 из 165, а репертуары из коры головного мозга – 84 из 165, при этом 51 репертуар был получен из лобной коры головного мозга, а остальные 33 - из височной. Все репертуары из периферической крови были получены с использованием в качестве матрицы геномной ДНК, а для приготовления 64 репертуаров из коры головного мозга была использована РНК (Рисунок 7). Среднее число прочтений на библиотеку после фильтрации всех непродуктивных CDR3 регионов (содержащих стоп кадон или сдвиг рамки считывания) составило 10^5 – 10^6 . Среднее число уникальных клонотипов для периферической крови составило 5×10^3 ($\pm 2 \times 10^3$) на образец, а для коры головного мозга - 82 (± 53) на образец. Суммарно по всем образцам было детектировано 439049 клонотипов из периферической крови и 6872 клонотипов из ткани головного мозга. Из этих клонотипов уникальными оказались 244584 для образцов периферической крови и 4848 для образцов головного мозга. При этом публичными клонотипами (встречающимися более чем у одного человека) из них являлись 36953 (15,1%) в крови и 800 (16,5%) в тканях головного мозга. Более того, 42,5% от всех клонотипов, обнаруженных в тканях головного мозга также встречались хотя бы в одном репертуаре периферической крови. Здесь стоит отметить, что при подготовке данных секвенирования была применена встроенная в VDJtools функция деконтаминации «decontamination» анализируемых образцов, которая удаляет клонотипы с малой частотой из репертуара при условии, если в другом образце данный клонотип широко представлен. В процессе приготовления библиотек использовались двойные адаптеры («Dual Indexes adapters» Illumina), образующие уникальную пару, что минимизирует кроссконтаминацию

образцов в процессе секвенирования. Более того, для приготовления библиотек из разных типов тканей были использованы разные помещения и приборы Miseq Illumina.

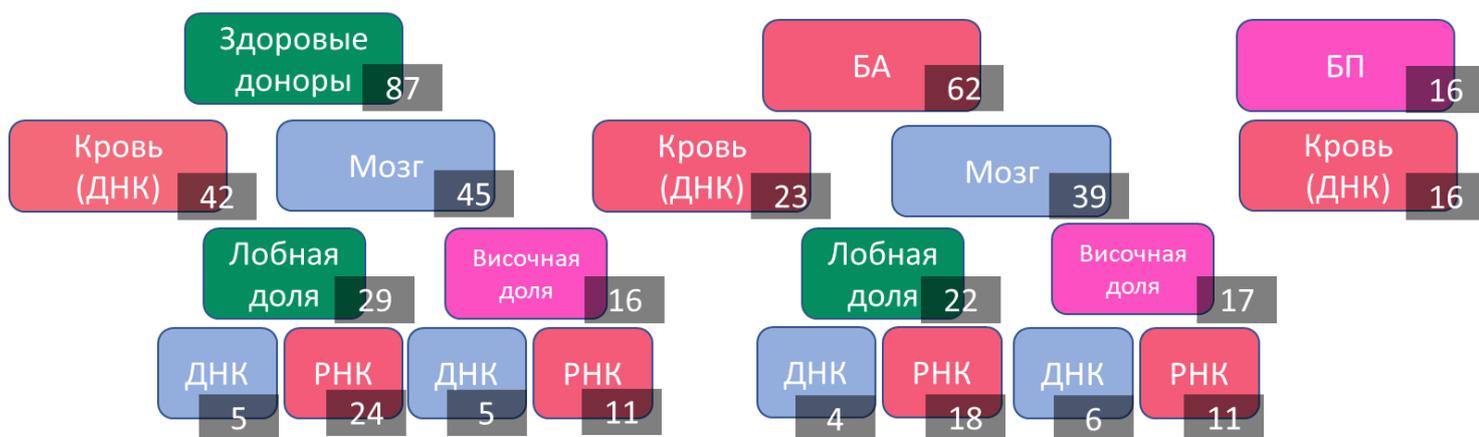


Рисунок 7 Распределение образцов, использованных для приготовления библиотек CDR3 регионов TRG человека, по диагнозу, ткани и матрице (ДНК или РНК). Цифрами вынесено количество образцов. БА – болезнь Альцгеймера, БП – болезнь Паркинсона.

Для корректного сравнения свойств репертуаров TRG между группами (Мозг-Кровь или БА-Контроль), чтобы исключить влияние возраста и пола, были выбраны возрастные ограничения таким образом, чтобы в анализируемых группах не было статистических отличий (тест Колмогорова-Смирнова для отличий распределений; $p > 0.05$) по возрасту и полу (Рисунок 8). В результате, в сравнении групп по тканям участвовали образцы, полученные от пациентов с 55 до 86 лет. При сравнении репертуаров TRG группы пациентов с БА и контрольной группы анализировали образцы периферической крови от пациентов с 55 до 83 лет и образцы тканей головного мозга от пациентов с 60 до 95 лет. Более поздний возраст доноров тканей связан с тем, что ткани головного мозга забирались посмертно. Также отдельно стоит отметить, что в некоторых банках тканей точный возраст доноров старше 90 лет не указан ввиду политики конфиденциальности.

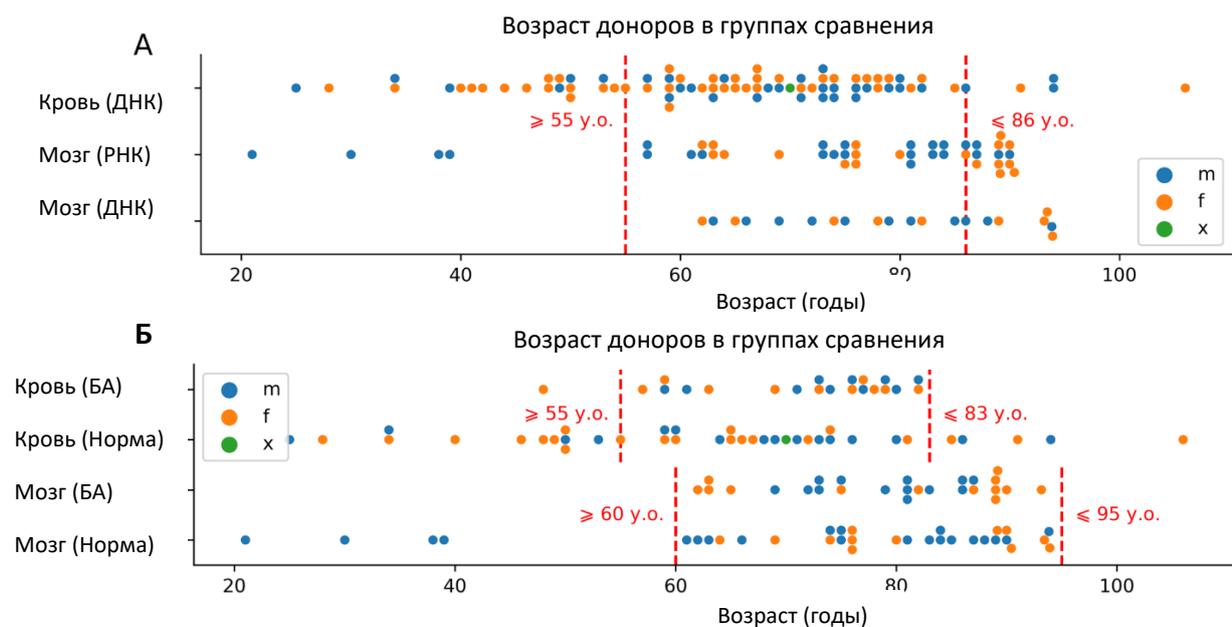


Рисунок 8 Распределение по возрасту в групповых сравнениях репертуаров CDR3 регионов TRG. Цветом отмечен пол индивида: синий – мужчины, оранжевый – женщины, зеленый – не установлен. Вертикальными пунктирными линиями отмечены возрастные ограничения для каждого из групповых сравнений: ДНК-репертуары крови против ДНК- и РНК- репертуаров головного мозга (А); репертуары из крови и головного мозга пациентов с БА против репертуаров контрольной группы (Б).

Возрастные изменения репертуара TRG человека

Возрастные изменения характерны для В- и Т- клеточных репертуаров, как уже было сказано в обзоре литературы. Наблюдается общая тенденция к уменьшению разнообразия и росту клональности при старении [139,140]. Количество $\gamma\delta$ Т-клеток плавно снижается с возрастом, что наблюдается в том числе и для основной субпопуляции клеток периферической крови - $V\gamma9V\delta2$, число которых начинает снижаться уже после 30 лет [85]. На наших данных, где в качестве исходного материала используется тотальная ДНК или РНК без предварительной сортировки клеток, также наблюдается снижение разнообразия и увеличение средних показателей клональности.

Итак, для оценки влияния старения на репертуары TRG были составлены панели образцов периферической крови доноров от 25 до 106 лет и образцов тканей головного мозга доноров от 21 до >90 лет. Для разделения на группы была использована медиана возраста в полной выборке, таким образом, в анализе участвовали следующие группы: репертуары из крови пациентов моложе 66 лет ($n = 39$, женщины/мужчины 26/13, возраст 25-65, средний возраст =52) и группы пациентов 66 лет и старше ($n = 40$, женщины/мужчины /н.у 19/20/1, возраст 66-106, средний возраст = 76.7); ДНК-репертуары из головного мозга доноров моложе 80

лет ($n = 10$, женщины/мужчины 4/6, возраст 62-79, средний возраст 70.3) и доноров 80 лет и старше ($n = 10$, женщины/мужчины 5/5, возраст 81-93, средний возраст 88.5); РНК-репертуары доноров моложе 80 лет ($n = 22$, женщины/мужчины 9/13, возраст 21-76, средний возраст 61.8) и доноров 80 лет и старше ($n = 22$, женщины/мужчины 10/12, возраст 80-90, средний возраст 86.2). В сравнении доноров без выявленных нейродегенеративных патологий участвовали следующие группы: ДНК-репертуары крови доноров моложе 66 лет ($n = 21$, женщины/мужчины 14/7, возраст 25-65, средний возраст 50.3) и доноров 66 лет и старше ($n = 20$, женщины/мужчины/н.у 8/11/1, возраст 66-106, средний возраст 77.2); ДНК-репертуары из коры головного мозга доноров моложе 80 лет ($n = 4$, женщины/мужчины 2/2, возраст 63-78, средний возраст 70.3) и доноров 80 лет и старше ($n = 6$, женщины/мужчины = 2/4, возраст 81-93, средний возраст 89.2); РНК-репертуары из коры головного мозга доноров моложе 80 лет ($n = 16$, женщины/мужчины 5/11, возраст 21-76, средний возраст 59.4) и доноров 80 лет и старше ($n = 10$, женщины/мужчины 4/6, возраст 80-90, средний возраст 86.7). Использовались двусторонний t-критерий Стьюдента или критерий Манна-Уитни в случае непараметрических данных.

Для групповых сравнений использовали медиану возрастов: 66 лет для образцов крови и 80 лет для образцов головного мозга. Для уменьшения влияния глубины секвенирования на анализ клоальности использовалась функция «downsampling» на 50000 ридов. В результате было обнаружено, что в группе доноров 66 лет и старше в сравнении с группой моложе 66 лет среднее количество клонотипов в репертуаре крови меньше в 1,46 раз (Рисунок 9А; $p = 4.4 \times 10^{-05}$). Этот эффект остается статистически значимым при анализе репертуаров крови только условно здоровых доноров ($p = 0.0007$; Рисунок 9Е). Регрессионный анализ числа клонотипов в репертуарах периферической крови также выявил уменьшение числа клонотипов с возрастом ($p = 7.004 \times 10^{-06}$).

При анализе репертуаров TRG из тканей головного мозга возрастные различия в группах доноров моложе 80 и старше 80 лет также заключаются в уменьшении числа уникальных клонотипов с возрастом, однако эффект выражен слабее и статистическая значимость есть для данных, полученных с использованием ДНК в качестве стартового материала, но не РНК. Однако при объединении ДНК- и РНК-репертуаров статистическая значимость сохраняется ($p = 0,026$; Рисунок 9Б).

Менее выраженный возрастной эффект на данных из тканей головного мозга можно объяснить следующими причинами. Во-первых, постмортальные образцы получены от доноров в среднем более позднего возраста, чем образцы периферической крови, поэтому

возраст сравнения также выше (старше и моложе 80 лет, в то время как для периферической крови – старше и моложе 66 лет), а снижение разнообразия может быть более выражено в период раннего старения. Во-вторых, репертуары из тканей головного мозга сильно отличаются от репертуаров из периферической крови по числу обнаруженных клонотипов из-за меньшего числа Т-клеток в ткани. Выборки клонотипов из крови являются более репрезентативными, что является существенным фактором при исследовании разнообразия. В-третьих, большая часть данных из ткани головного мозга получена с использованием РНК в качестве стартового материала, а, следовательно, чувствительна к уровню экспрессии ТКР, который может отличаться в зависимости от последовательности CDR3. При анализе ДНК-репертуаров одна функциональная перестройка ТКР соответствует одной клетке, что дает более точные полуколичественные результаты.

Далее клональность репертуаров была оценена с использованием энтропии Шеннона и нормализованной энтропии по формуле Шеннона-Винера. Для репертуаров из периферической крови было показано значимое уменьшение разнообразия и, соответственно, увеличение клональности с использованием обеих метрик ($p = 0.0003$ (энтропия Шеннона); Рисунок 9В; $p=0.04$ (энтропия Шеннона Винера); Рисунок 9Д). Снижение энтропии Шеннона было статистически значимо при анализе только условно здоровых доноров (Рисунок 9з)

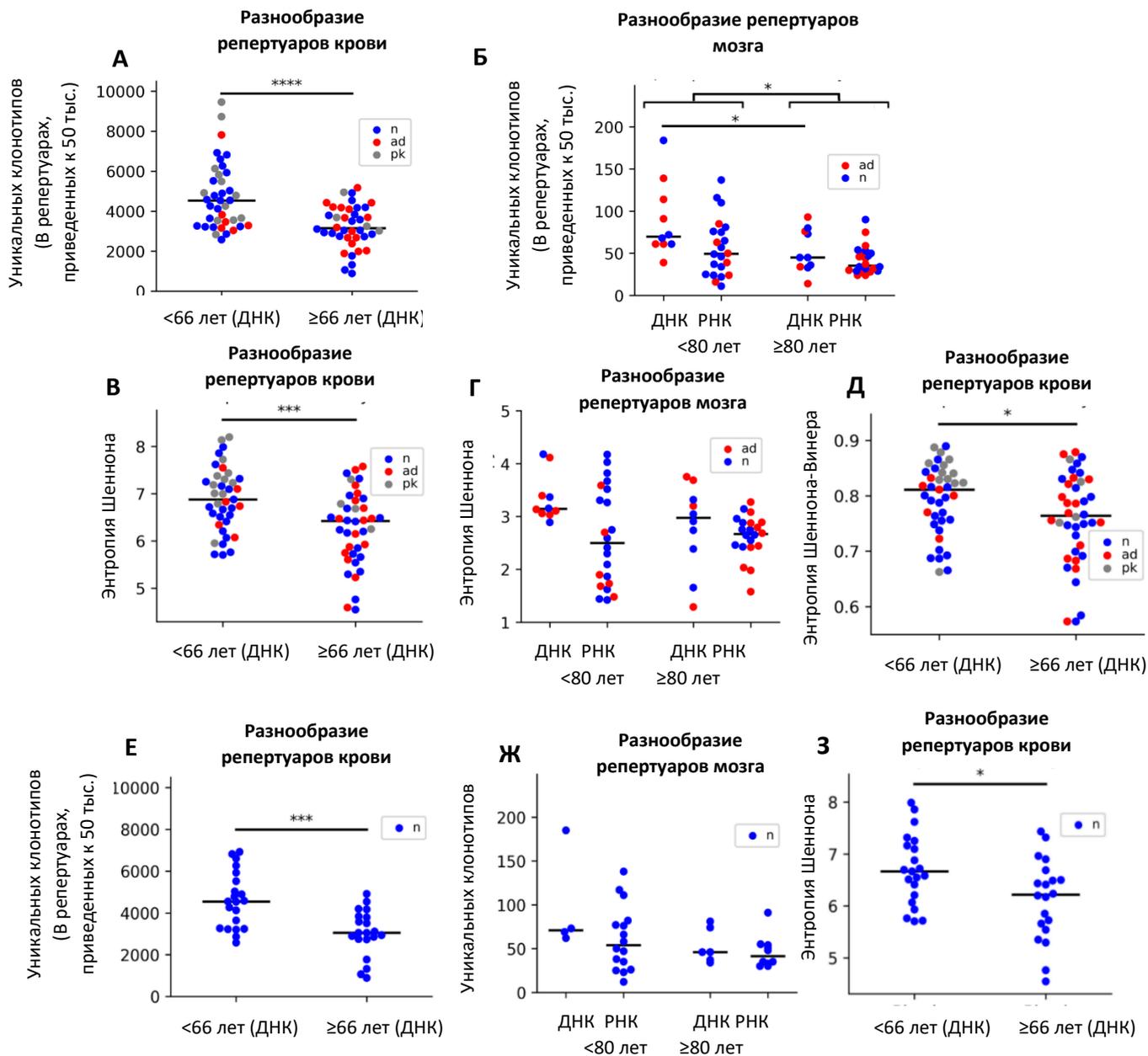


Рисунок 9 Изменения разнообразия и клональности репертуаров CDR3 регионов TRG человека в процессе старения. Среднее число уникальных клонотипов после приведения репертуаров к 50000 прочтениям снижается с возрастом (А, Б). Индексы энтропии Шеннона (В) и нормализованной энтропии Шеннона-Винера (Д) ниже в группе более пожилого возраста по данным репертуаров из периферической крови, но не головного мозга (Г). Снижение разнообразия репертуаров сохраняется при анализе только здоровых индивидов (Е-З). Красным обозначены данные для пациентов с БА (ad), серым – пациентов с БП (pk), синим – норма (n). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ и **** $P < 0.0001$

Чтобы изучить качественные изменения репертуаров TRG с возрастом были проанализированы частоты использованных V-сегментов. На данных из периферической крови статистически значимых изменений выявлено не было. Однако на ДНК-репертуарах

из тканей коры головного мозга были получены корреляции частот TRGV9 и TRGV2/4/8 с возрастом (Таблица 3).

Таблица 3 Результаты корреляционного анализа частот TRGV сегментов.

Тип Данных	TRGV сегмент	Коэффициент корреляции и Пирсона	р-значение (Пирсон)	Коэффициент корреляции Спирмана	р-значение (Спирман)
Кровь (ДНК)	TRGV1	-0,10	0,402	-0,16	0,171
Кровь (ДНК)	TRGV10	-0,03	0,778	-0,11	0,328
Кровь (ДНК)	TRGV11	0,14	0,214	0,14	0,218
Кровь (ДНК)	TRGV2	-0,01	0,918	-0,03	0,795
Кровь (ДНК)	TRGV3	0,13	0,260	0,04	0,756
Кровь (ДНК)	TRGV4	0,02	0,894	-0,08	0,508
Кровь (ДНК)	TRGV5	0,01	0,929	-0,01	0,899
Кровь (ДНК)	TRGV5P	0,07	0,542	-0,10	0,402
Кровь (ДНК)	TRGV6	0,01	0,913	-0,06	0,609
Кровь (ДНК)	TRGV7	0,05	0,636	-0,04	0,729
Кровь (ДНК)	TRGV8	0,00	0,981	0,00	0,987
Кровь (ДНК)	TRGV9	-0,02	0,856	0,01	0,928
Кровь (ДНК)	TRGV2/4/8	0,00	0,984	-0,03	0,781
Мозг (РНК)	TRGV10	-0,16	0,295	-0,07	0,669
Мозг (РНК)	TRGV11	-0,02	0,923	-0,14	0,371
Мозг (РНК)	TRGV2	-0,21	0,165	-0,07	0,634
Мозг (РНК)	TRGV3	0,22	0,143	0,14	0,359
Мозг (РНК)	TRGV4	0,26	0,090	0,31	0,040
Мозг (РНК)	TRGV5	0,18	0,255	0,20	0,204
Мозг (РНК)	TRGV5P	0,15	0,343	0,09	0,581
Мозг (РНК)	TRGV7	-0,32	0,034	-0,23	0,126
Мозг (РНК)	TRGV8	-0,04	0,787	-0,11	0,481
Мозг (РНК)	TRGV9	0,06	0,721	0,11	0,490
Мозг (РНК)	TRGV2/4/8	0,01	0,945	0,11	0,480
Мозг (ДНК)	TRGV1	-0,36	0,122	-0,34	0,145

Мозг (ДНК)	TRGV10	0,05	0,833	-0,02	0,925
Мозг (ДНК)	TRGV11	-0,05	0,831	-0,19	0,425
Мозг (ДНК)	TRGV2	0,26	0,266	0,29	0,210
Мозг (ДНК)	TRGV3	0,24	0,303	0,32	0,169
Мозг (ДНК)	TRGV4	0,35	0,131	0,34	0,145
Мозг (ДНК)	TRGV5	0,37	0,106	0,32	0,164
Мозг (ДНК)	TRGV5P	0,31	0,183	0,50	0,025
Мозг (ДНК)	TRGV7	-0,31	0,184	-0,41	0,072
Мозг (ДНК)	TRGV8	0,34	0,140	0,27	0,254
Мозг (ДНК)	TRGV9	-0,55	0,011	-0,55	0,013
Мозг (ДНК)	TRGV2/4/8	0,52	0,020	0,52	0,020
Кровь (ДНК) ТОП20	TRGV10	0,02	0,864	-0,01	0,910
Кровь (ДНК) ТОП20	TRGV11	0,08	0,463	0,10	0,360
Кровь (ДНК) ТОП20	TRGV2	-0,01	0,931	0,02	0,889
Кровь (ДНК) ТОП20	TRGV3	0,18	0,117	0,06	0,628
Кровь (ДНК) ТОП20	TRGV4	0,02	0,841	0,05	0,672
Кровь (ДНК) ТОП20	TRGV5	0,09	0,432	-0,01	0,898
Кровь (ДНК) ТОП20	TRGV5P	0,08	0,463	0,10	0,360
Кровь (ДНК) ТОП20	TRGV7	0,09	0,434	0,05	0,667
Кровь (ДНК) ТОП20	TRGV8	0,03	0,767	0,05	0,686
Кровь (ДНК) ТОП20	TRGV9	-0,09	0,443	-0,05	0,634
Кровь (ДНК) ТОП20	TRGV2/4/8	0,02	0,891	-0,02	0,841
Мозг (РНК) ТОП20	TRGV10	-0,14	0,380	-0,06	0,723
Мозг (РНК) ТОП20	TRGV11	0,00	0,980	-0,12	0,430
Мозг (РНК) ТОП20	TRGV2	-0,17	0,283	0,01	0,948
Мозг (РНК) ТОП20	TRGV3	0,22	0,149	0,20	0,203
Мозг (РНК) ТОП20	TRGV4	0,29	0,059	0,37	0,013
Мозг (РНК) ТОП20	TRGV5	0,09	0,543	0,15	0,338
Мозг (РНК) ТОП20	TRGV7	-0,22	0,156	-0,27	0,073
Мозг (РНК) ТОП20	TRGV8	-0,02	0,886	-0,04	0,808
Мозг (РНК) ТОП20	TRGV9	-0,03	0,872	0,04	0,818
Мозг (РНК) ТОП20	TRGV2/4/8	0,08	0,589	0,20	0,203
Мозг (ДНК) ТОП20	TRGV10	0,26	0,267	0,11	0,645

Мозг (ДНК) ТОП20	TRGV11	0,32	0,162	0,46	0,040
Мозг (ДНК) ТОП20	TRGV2	0,44	0,052	0,45	0,046
Мозг (ДНК) ТОП20	TRGV3	0,30	0,196	0,39	0,094
Мозг (ДНК) ТОП20	TRGV4	0,43	0,059	0,42	0,068
Мозг (ДНК) ТОП20	TRGV5	0,38	0,099	0,37	0,110
Мозг (ДНК) ТОП20	TRGV5P	0,21	0,372	0,18	0,448
Мозг (ДНК) ТОП20	TRGV7	-0,08	0,746	-0,13	0,571
Мозг (ДНК) ТОП20	TRGV8	0,37	0,113	0,36	0,123
Мозг (ДНК) ТОП20	TRGV9	-0,70	0,001	-0,64	0,002
Мозг (ДНК) ТОП20	TRGV2/4/8	0,61	0,005	0,60	0,005

Интересно, что частота наиболее распространенного в крови TRGV9 сегмента постепенно снижается с возрастом в тканях головного мозга ($p = 0.001$; Рисунок 10А), в то время как частота более тканеспецифичных клонотипов с использованием TRGV2/4/8 сегментов – растет ($p = 0.005$; Рисунок 10Б). Результаты, представленные на рисунке 10, были получены с использованием 20 наиболее распространенных клонотипов в каждом репертуаре (Топ 20 клонотипов) для того, чтобы минимизировать влияние глубины секвенирования и объема полученных репертуаров. Для репертуаров головного мозга предпочтительно использование коэффициентов корреляции, посчитанные методом Пирсона, так как частоты были распределены нормально, в то время как для репертуаров периферической крови - методом Спирмана, как для непараметрических данных.

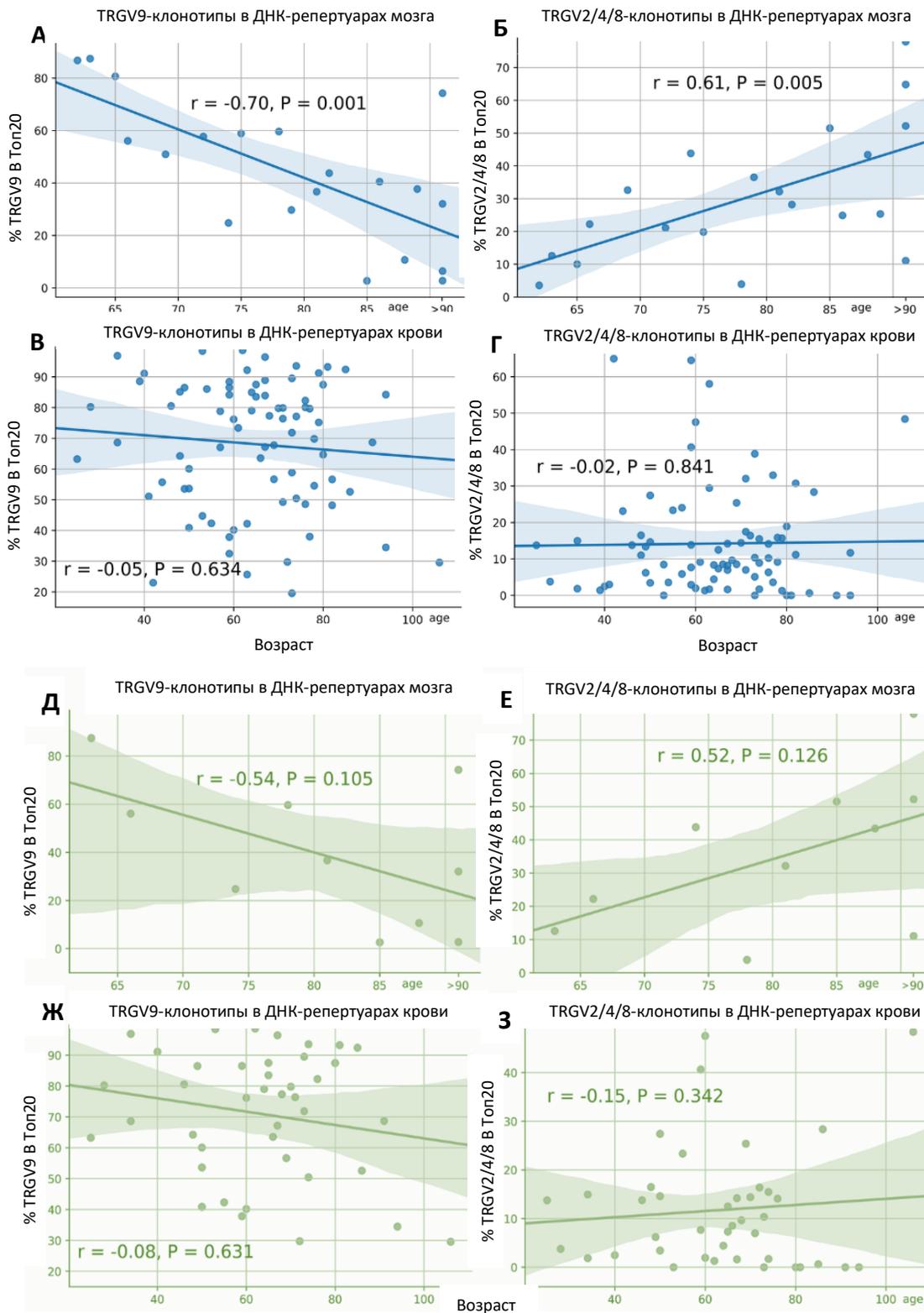


Рисунок 10 Регрессионный анализ частот 1кGV9 и TRGV2/4/8 сегментов в Top 20 клонотипов в ДНК-репертуарах TRG из тканей головного мозга человека и периферической крови при старении. Частота клонотипов с использованием сегмента TRGV9 с возрастом в головном мозге снижается (А), в то время как клонотипы с TRGV2/4/8 становятся более широко представлены в репертуаре (Б), данная тенденция сохраняется при анализе только репертуаров из контрольной группы (Д-Е), но не характерна для репертуаров периферической крови (В,Г,Ж,З).

Помимо снижения разнообразия с возрастом, наблюдается небольшое укорочение средней длины CDR3 регионов функциональных TRG в процессе старения в периферической крови, при этом данная закономерность характерна как для смешанной группы больных и здоровых доноров ($p = 0.0124$), так и для группы только условно здоровых доноров ($p = 0.008$), но не выявляется на данных репертуаров из коры головного мозга (Рисунок 11). Изменение средней длины CDR3 регионов при старении было отмечено ранее, например, для репертуаров TCR β наивных Т-клеток [141].

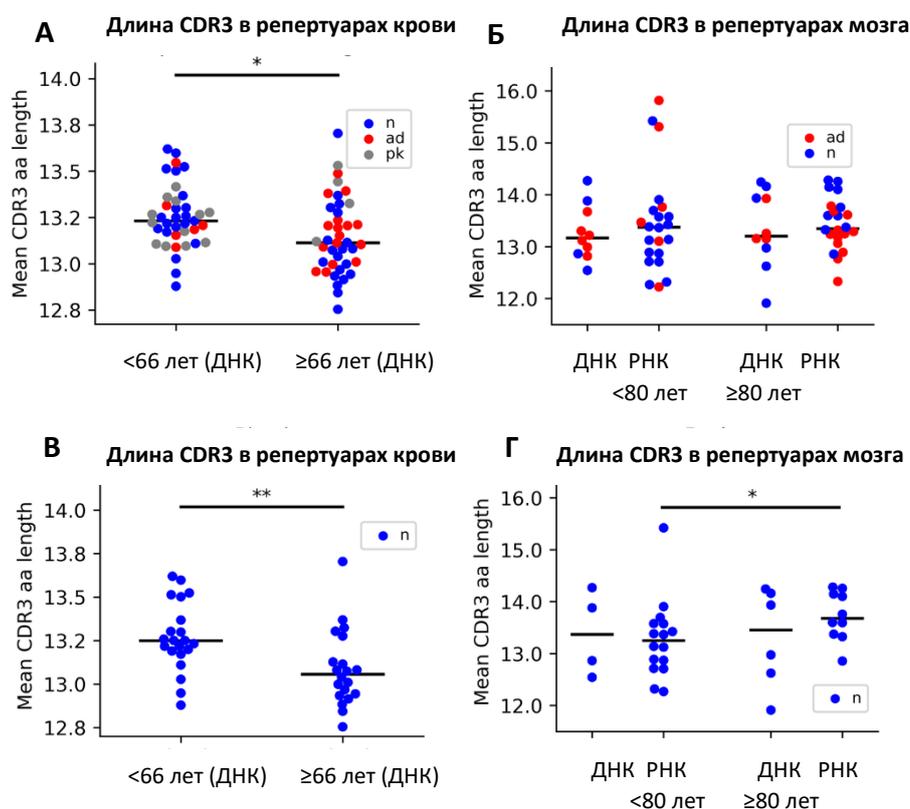


Рисунок 11 Анализ средней длины CDR3 регионов TRG с возрастом. Средняя длина клонотипов в репертуарах периферической крови меньше в группе людей 66 лет и старше, как на данных со смешанными диагнозами (А), так и на данных контрольной группы (В), на данных из головного мозга средняя длина репертуаров не меняется (Б) или увеличивается в случае РНК-репертуаров контрольной группы (Г). Красным обозначены данные для пациентов с БА (ad), серым – пациентов с БП (pk), синим – норма (n). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Сравнение репертуаров TRG головного мозга и периферической крови человека.

Образцы височных и лобных долей коры головного мозга были получены из банков тканей, где они были заморожены без предварительной перфузии и применения криопротекторов, а, следовательно, в капиллярах находились остатки крови. Также известно, что в менингеальных оболочках мозга находятся Т-клетки (в литературе описаны $\alpha\beta$ Т-клетки), которые участвуют в нормальном функционировании ЦНС [142], а также эндотелий сосудов головного мозга с помощью экспрессии молекул МНСII способны регулировать проницаемость ГЭБ для определенных Т-клеток [143], а следовательно, клетки, находящиеся в пристеночном пространстве кровеносных сосудов также могут отличаться по своим функциям и, возможно, ТКР. Таким образом, при анализе репертуаров головного мозга предполагалось увидеть либо характерные черты репертуаров TRG крови (олигоклональность, высокая частота TRGV9 сегмента, известные публичные клонотипы), либо более уникальные особенности, свидетельствующие о тканеспецифичном отборе Т-клеток.

Так как репертуары из головного мозга и периферической крови сильно отличаются по размеру (числу обнаруженных клонов) из-за очевидной разницы в количестве клеток, все анализы проводились на Топ20 клонотипов с пересчетом соответствующих частот. Сегменты TRGV2, TRGV4, TRGV8 были объединены в одну группу, так как они являются близкородственными [144] и анализируемые нуклеотидные последовательности отличаются всего несколькими нуклеотидами, что во многих случаях делает невозможным достоверно определить конкретный сегмент, вошедший в состав CDR3 региона TRG. В сравнении участвовали образцы от доноров в возрасте от 55 до 86 лет.

В сравнении участвовали три группы данных: ДНК-репертуары из крови (n=55, женщины/мужчины/н.у 29/25/1, возраст 55-86, средний возраст 69.73), ДНК репертуары из головного мозга (n=14, женщины/мужчины 5/9, возраст 62-86, средний возраст 74.07) и РНК репертуары головного мозга (n=28, женщины/мужчины 11/17, возраст 57-86, средний возраст 73.57). Для сравнения использовали критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна и поправкой на множественное тестирование Холма-Бонферрони.

В начале были проведены попарные сравнения частот сегментов TRGV2, TRGV3, TRGV4, TRGV5, TRGV5P, TRGV7, TRGV8, TRGV9, TRGV10, TRGV11 в трех группах данных: ДНК репертуары периферической крови, ДНК репертуары головного мозга, РНК репертуары головного мозга (Таблица 4). Были выявлены статистически значимые отличия репертуаров крови и головного мозга. Наиболее выраженной является разница в частотах

наиболее широко представленного TRGV9 сегмента: в репертуарах головного мозга она значительно ниже, чем в периферической крови (Рисунок 13А; $p = 0.045$ для ДНК-репертуаров и $p = 9.65e-08$ для РНК-репертуаров). Доли других TRGV сегментов в репертуарах головного мозга, соответственно, увеличивались. Наиболее выраженные результаты были получены после объединения TRGV2, TRGV4 и TRGV8 сегментов в одну группу (TRGV2/4/8), средняя частота которой значимо выше в репертуарах головного мозга в сравнении с периферической кровью (Рисунок 13Б; $p = 0.028$ и $p = 0.0001$ для ДНК и РНК репертуаров, соответственно). При переходе от Топ20 клонотипов к полным репертуарам разница частот TRGV сегментов сохраняется ($p = 0.0002$ при сравнении частоты TRGV9 между ДНК репертуарами крови и РНК репертуарами мозга; $p = 0.008$ и $p = 0.009$ при сравнении частот TRGV2/4/8 в крови и ДНК и РНК репертуарах мозга, соответственно).

Таблица 4 Сравнительный анализ частот TRGV сегментов в репертуарах из коры головного мозга и периферической крови

TRGV	KRUSKAL p-значение	Кровь (ДНК) vs Мозг (ДНК), p- значение	Кровь (ДНК) vs Мозг (РНК), p-значение	Мозг (ДНК) vs Мозг (РНК), p-значение
TRGV2	0,014	0,041	0,060	0,475
TRGV3	0,005	0,846	0,004	0,076
TRGV4	0,026	0,810	0,034	0,087
TRGV5	0,011	0,203	0,013	0,603
TRGV5P	0,683			
TRGV7	0,206			
TRGV8	0,001	0,002	0,021	0,216
TRGV9	1,6E-07	0,045	9,6E-08	0,066
TRGV10	0,007	0,111	0,011	0,758
TRGV11	0,110			
*Данные были проанализированы с помощью критерия Kruskal-Wallis ANOVA с апостериорным тестом Данна				

Для популяции $\gamma\delta$ T-клеток крови характерно присутствие публичных клонотипов, то есть последовательностей ТКР, часто встречающихся у разных индивидов. Наиболее распространённым публичным клонотипом крови является “germ-line” (зародышевой линии) клонотип, несущий CDR3 с канонической перестройкой CALWE(V)QELGKKIKVF. Это перестройка образуется с использованием сегментов TRGV9 и TRGJP без вставки из внематричных нуклеотидов [54,145]. Частично, высокая частота TRGV9 в репертуарах крови обуславливается высокой частотой данной перестройки. Для качественного

сравнения репертуаров крови и головного мозга на уровне клонотипов были выбраны следующие две группы: CALW...LGKKIKVF (TRGV9-TRGJP клонотипы, содержащие в основном публичные CALWE(V)QELGKKIKVF клоны) и CALW...YYKKLF в качестве группы сравнения (TRGV9-J1/J2 клонотипы, вторая по частоте популяция TRGV9, встречающаяся в литературе в контексте мультиформной глиобластомы [146]). Было показано, что клоны CALW...LGKKIKVF преобладают в периферической крови, но не в тканях головного мозга (Рисунок 13В; $p = 0.0096$ и $p = 0.0004$ для ДНК и РНК репертуаров мозга, соответственно). При этом в частотах CALW...YYKKLF разницы обнаружено не было (Рисунок 13Г; тест Краскела $p = 0.16$). Отличия между репертуарами крови и головного мозга по частотам всех TRGV9 клонов и канонической перестройки TRGV9-TRGJP в частности, свидетельствуют о том, что репертуар головного мозга в меньшей степени обусловлен контаминацией образцов периферической кровью из-за отсутствия перфузии, так как происходит увеличение доли более редких для крови перестроек и уменьшение доли клонов, наиболее характерных для периферической крови.

Далее были проанализированы физикохимические свойства репертуаров TRG в контексте сравнения репертуаров крови и головного мозга. Сравнились средневзвешенные значения следующих характеристик: длина CDR3 (количество аминокислот), индекс гидропатии (по шкале Кайта-Дулиттла), объём (Å^3) [147], сила или потенциал взаимодействия [148]. Все эти характеристики, нормировались на длину CDR3. В сравнении репертуаров крови и головного мозга было показано, что клонотипы, полученные из головного мозга в среднем обладают большей гидрофильностью (Рисунок 13Е; $p = 0.016$ и $p = 7.757e-07$ для ДНК и РНК репертуаров, соответственно). Разница в индексах гидропатии между клонами, выделенными из крови и головного мозга, примечательна тем, что гидрофобность этих двух тканей, действительно, сильно отличается (для головного мозга характерно большое количество липидов), кроме того, для $\gamma\delta$ T-клеток описаны липидные антигены.

Важно отметить, что доля функциональных перестроек CDR3 относительно всех перестроенных TRG по нашим данным не изменяется между тканями ($33,4 \pm 5,2\%$ для ДНК-репертуаров крови и $33,9 \pm 9,8\%$ для ДНК-репертуаров мозга), однако увеличивается для РНК-репертуаров ($46,8 \pm 14,8\%$), что, возможно, связано с более быстрой деградацией нефункциональных молекул РНК (Рисунок 12).

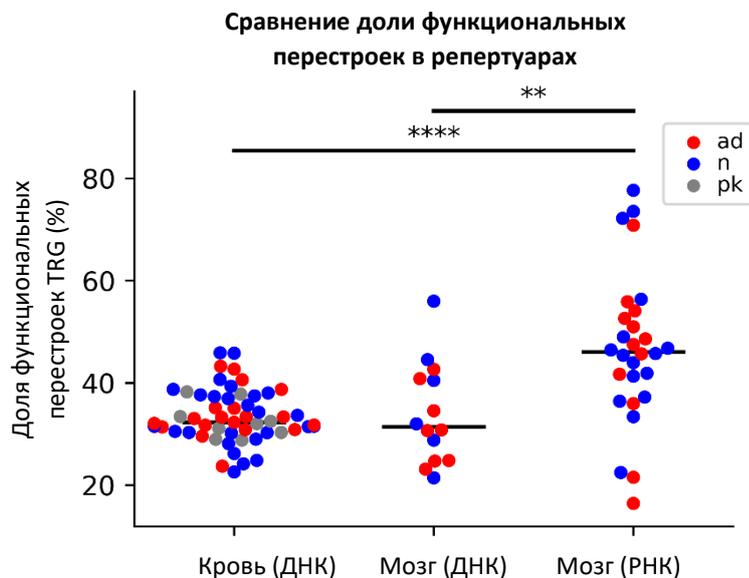


Рисунок 12 Сравнение доли функциональных перестроек TRG в репертуарах крови и мозга. ad – болезнь Альцгеймера, pk – болезнь Паркинсона, n – норма. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$

По доле функциональных перестроек можно приблизительно оценить количество $\gamma\delta$ T-клеток по отношению к $\alpha\beta$ T-клеткам. Чем больше процент функциональных перестроек, тем больше пропорция $\gamma\delta$ T-клеток, так как в $\alpha\beta$ T-клетках преимущественно нефункциональные TRG перестройки. Следовательно, тот факт, что не наблюдается разницы между процентом функциональных перестроек крови (ДНК) и коры головного мозга (ДНК), говорит о том, что, вероятно, изменения репертуара не связаны со снижением доли $\gamma\delta$ T-клеток.

Особенности TRG репертуара индивидов с болезнью Альцгеймера

Выявление клонотипов Т- и В- клеточных рецепторов, характерных для того или иного заболевания, является распространенной научной задачей, решая которую необходимо принимать во внимание следующие факторы: во-первых, на один и тот же антиген отбираются клоны, несущие разные последовательности иммуноглобулиновых рецепторов, а, следовательно, у разных индивидов, с большой вероятностью, в ходе одного и того же заболевания отбираются разные клонотипы. Поэтому целесообразно анализировать физико-химические свойства клонотипов, а не их аминокислотные последовательности. Во-вторых, нужно учитывать другие сопутствующие заболевания и недавно перенесенные инфекции, которые приводят к возникновению клонотипов с высокими частотами, не относящимися к изучаемому заболеванию. Стандартным подходом в решении данной задачи является иммунизация с получением репертуара до и после введения антигена или анализ репертуара в острой фазе заболевания. При таком подходе основное внимание уделяется клонотипам с высокими частотами. При исследовании иммунных репертуаров при хронических заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, необходимо анализировать все возможные перестройки, в том числе редкие варианты. Иммунная компонента нейродегенеративных заболеваний не является основной, биологический материал собирается на разной стадии течения заболевания, возможны сопутствующие инфекционные заболевания, пожилой возраст доноров приводит к увеличению клональности в репертуарах – все эти факторы затрудняют поиск клонотипов, ассоциированных с болезнью Альцгеймера. Поэтому нами был разработан биоинформатический подход, который позволяет анализировать в том числе редкие перестройки CDR3.

В дальнейшем анализе использовались следующие выборки: репертуары из крови пациентов с БА (n = 20, женщины/мужчины 10/10, возраст 57-82, средний возраст 72.3) и доноров без выявленных нейродегенеративных патологий (n = 21, женщины/мужчины/н.у 10/10/1, возраст 55-81, средний возраст 68); репертуары из коры головного мозга индивидов с БА (n = 26, женщины/мужчины 13/13, возраст 62-93, средний возраст 79.3) и без выявленных нейродегенеративных заболеваний (n = 29, женщины/мужчины 12/17, возраст 61-83, средний возраст 69.8). Для сравнения физико-химических свойств субрепертуаров использовались ANOVA или критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным критерием Данна, частоты клонотипов с выбранными характеристиками сравнивались с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента.

Первичный анализ частот TRGV сегментов (Таблица 5) и физико-химических свойств полных репертуаров (Рисунок 14 Анализ физико-химических свойств изначальных (А-3) и только TRGV9-TRGJP-субрепертуаров (И-Р) TRG в сравнении пациентов с болезнью Альцгеймера и) не выявил выраженных особенностей репертуаров больных по сравнению со здоровыми. Для сравнения использовали средневзвешенные показатели длины CDR3, молекулярного объема, потенциальной силы взаимодействия и индекса гидропатии. Статистической значимостью обладало только увеличение в показателях объема CDR3 регионов репертуаров из головного мозга пациентов с БА (Рисунок 14Д).

Таблица 5 Сравнительный анализ частот TRGV сегментов в репертуарах пациентов с болезнью Альцгеймера и без нейродегенеративных патологий.

Тип данных	Сегмент TRGV	Р-значение Манна-Уитни
Мозг	TRGV10	0,87
Мозг	TRGV11	0,57
Мозг	TRGV4	0,77
Мозг	TRGV9	0,46
Мозг	TRGV8	0,83
Мозг	TRGV2	0,99
Мозг	TRGV3	0,11
Мозг	TRGV7	0,79
Мозг	TRGV5	0,06
Мозг	TRGV5P	0,84
Кровь	TRGV10	0,38
Кровь	TRGV8	0,27
Кровь	TRGV3	0,42
Кровь	TRGV4	0,83
Кровь	TRGV7	0,80
Кровь	TRGV5	0,39
Кровь	TRGV2	0,11
Кровь	TRGV11	0,11
Кровь	TRGV9	0,14
Кровь	TRGV1	0,86
Кровь	TRGV5P	0,53

Анализ частот публичных клонотипов не выявил разницы между больными и здоровыми по найденным перестройкам CDR3.

Так как субпопуляция TRGV9-TRGJP клонов, в частности, клоны с канонической перестройкой, могут занимать более половины всего репертуара, тем самым оказывая сильное влияние на распределение частот остальных клонотипов, целесообразно

рассматривать TRGV9-TRGJP клоны и остальные клоны отдельно. Экспансия клонов, содержащих каноническую перестройку, является неспецифической реакцией на инфекции или опухолевую трансформацию клеток, поэтому из дальнейшего анализа исключили образцы, с долей TRGV9-TRGJP клонотипов более 40%. Таким образом, в дальнейшем анализе участвовали 21 образец периферической крови из контрольной группы и 20 образцов из группы БА, 29 образцов головного мозга из контрольной группы и 26 образцов из группы БА. Все группы сравнения не имели значимых отличий по полу и возрасту.

Сравнительный анализ физико-химических свойств не выявил особенностей субрепертуаров TRGV9-TRGJP больных БА по сравнению с контрольной группой индивидов как в репертуарах крови, так и головного мозга (Рисунок 14И-Р).

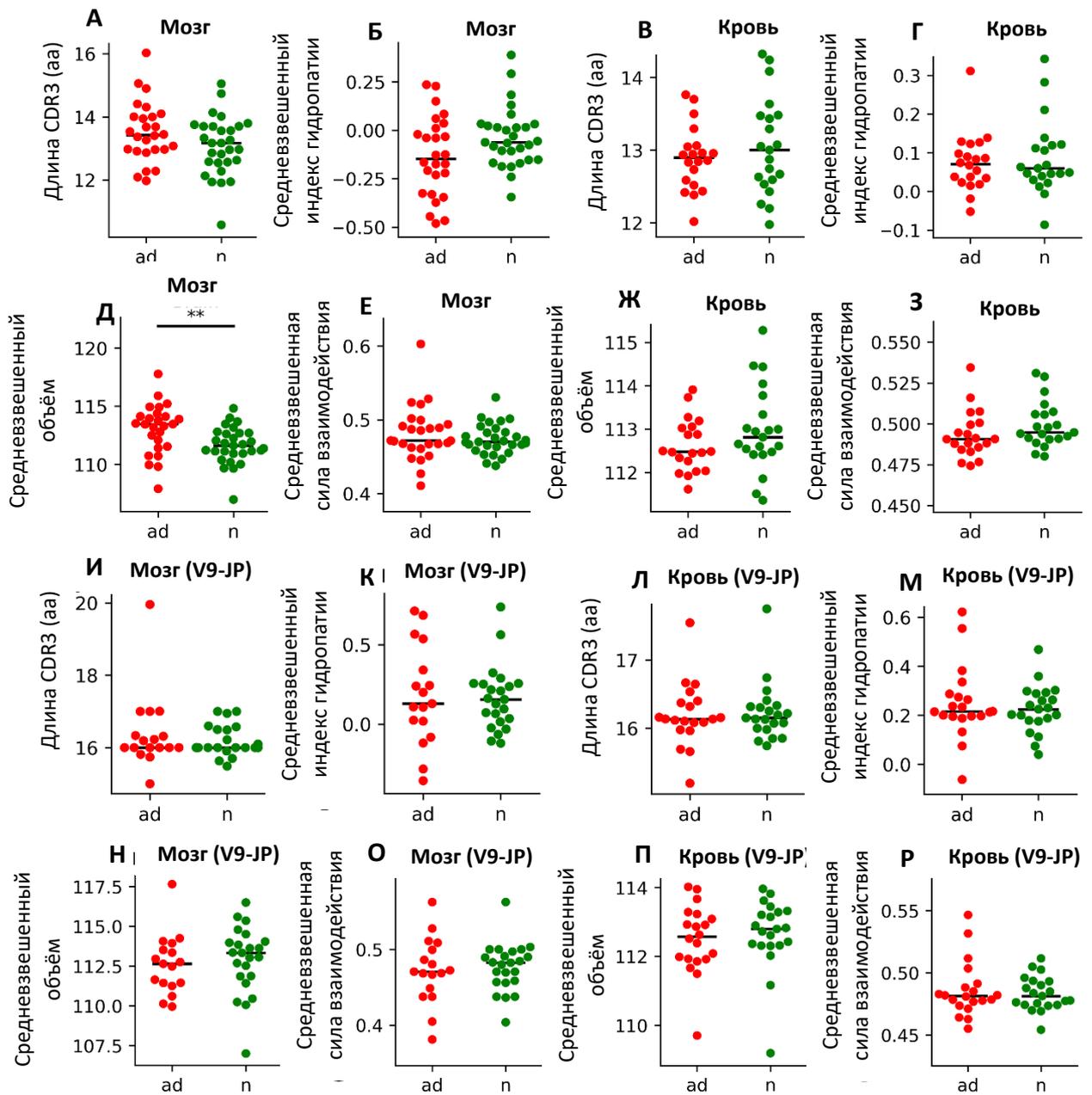


Рисунок 14 Анализ физико-химических свойств изначальных (А-З) и только TRGV9-TRGJP-субрепертуаров (И-Р) TRG в сравнении пациентов с болезнью Альцгеймера и индивидов без нейродегенеративных патологий. В анализе использовались значения взвешенной средней длины CDR3 региона (А, В, И, Л), взвешенного индекса гидропатии, нормализованного на длину CDR3 региона (Б, Г, К, М), взвешенного молекулярного объема, нормализованного на длину CDR3 региона (Д, Ж, Н, П) и взвешенной потенциальной силы взаимодействия, нормализованной на длину CDR3 региона (Е, З, О, Р). $**P < 0.01$.

Далее нами был разработан подход для поиска физико-химических особенностей клонотипов, частоты которых выше у больных по сравнению с контрольной группой, не только с одинаковыми аминокислотными последовательностями, но и с уникальными перестройками CDR3 региона. Преимуществом данного метода анализа репертуаров является то, что он позволяет учитывать непосредственно свойства ТКР, которые определяют связывание с антигеном, а не строгий аминокислотный состав. Данный метод анализа включает в себя четыре этапа.

Первым этапом является отбор клонотипов, которые встречаются хотя бы у двоих больных, но отсутствуют у всех проанализированных здоровых («Общие для БА»). В качестве группы сравнения также были отобраны все клонотипы, которые встречаются хотя бы у двоих доноров без БА, но не встречается ни у одного из проанализированных больных («Общие для Нормы»). На данном этапе важно минимизировать ошибки, которые могут возникать при приготовлении библиотек и дальнейшем секвенировании. Во-первых, необходимо использовать для приготовления библиотек адаптеры с индексами, уникальными с обоих концов. Это позволяет удалить на стадии предобработки данных химерные прочтения, образовавшиеся в результате смены матрицы. Во-вторых, следует использовать функцию «decontamination» в программе VDJtools, которая позволяет отфильтровать прочтения с низкой частотой из библиотеки, в том случае, если данная перестройка встречается с высокой частотой в другом образце. В итоге были найдены 40 «Общих для БА» в репертуарах головного мозга и 1255 «Общих для БА» в периферической крови (Рисунок 15).

Матрица пересечения клонотипов из головного мозга



Матрица пересечения клонотипов из крови



Рисунок 15 Матрицы пересечения клонотипов из репертуаров головного мозга (А) и периферической крови (Б). Были отобраны клонотипы (выделены красной рамкой), встречающиеся хотя бы у двоих пациентов из группы больных, но не встречающихся в группе нормы. Значения в матрице на рисунке А и Б обозначают число клонотипов, общих для числа доноров, указанных по осям.

На втором этапе проводится анализ физико-химических свойств «Общих для БА» клонотипов. Для этого сравниваются средневзвешенные на частоты значения длины, гидропатии, молекулярного объема и потенциальной силы взаимодействия CDR3 регионов между четырьмя группами: «Общие для БА», «Общие для Нормы», полные репертуары БА и полные репертуары нормы. Значения указанных величин для аминокислот, использованных для определения суммарных показателей CDR3 регионов, представлены в

Таблица 6. Для получения значений индексов гидропатии была использована шкала «гидропатии» Кайта и Дулиттла, которая учитывает потенциал гидрации аминокислотных остатков, а также расположение остатков внутри белковой глобулы [149].

Таблица 6 Значения параметров аминокислот, использованные в анализе физико-химических свойств CDR3 регионов TRG

Аминокислота	Однобуквенный код	Индекс гидропатии	Сила взаимодействия	Молекулярный объем (А³)
Isoleucine	I	4.5	1	124
Valine	V	4.2	1	105
Leucine	L	3.8	1	124
Phenylalanine	F	2.8	1	135
Cysteine	C	2.5	1	86
Methionine	M	1.9	1	124
Alanine	A	1.8	0	67
Glycine	G	-0.4	0	48
Threonine	T	-0.7	0	93
Serine	S	-0.8	0	73
Tryptophan	W	-0.9	1	163
Tyrosine	Y	-1.3	1	141
Proline	P	-1.6	0	90
Histidine	H	-3.2	0	118
Glutamic acid	E	-3.5	1	109
Glutamine	Q	-3.5	0	114
Aspartic acid	D	-3.5	0	91
Asparagine	N	-3.5	0	96

Lysine	K	-3.9	0	135
Arginine	R	-4.5	0	148

Далее выбирали показатели, которые наилучшим образом характеризуют БА-ассоциированные клонотипы для последующего кластерного анализа. В среднем по данным из головного мозга субрепертуар включал 4,8 клонотипа, по данным периферической крови – 159,1 клонотип, в то время как полные репертуары в среднем включали 76,4 и 4487,5 клонотипов, соответственно. Анализ физико-химических свойств субрепертуаров, состоящих из общих для БА клонов, обнаружил, что в мозге они отличаются более гидрофильными и большими по объему CDR3 регионами, а в крови более короткими и с меньшей потенциальной силой взаимодействия CDR3 регионами (Рисунок 16).

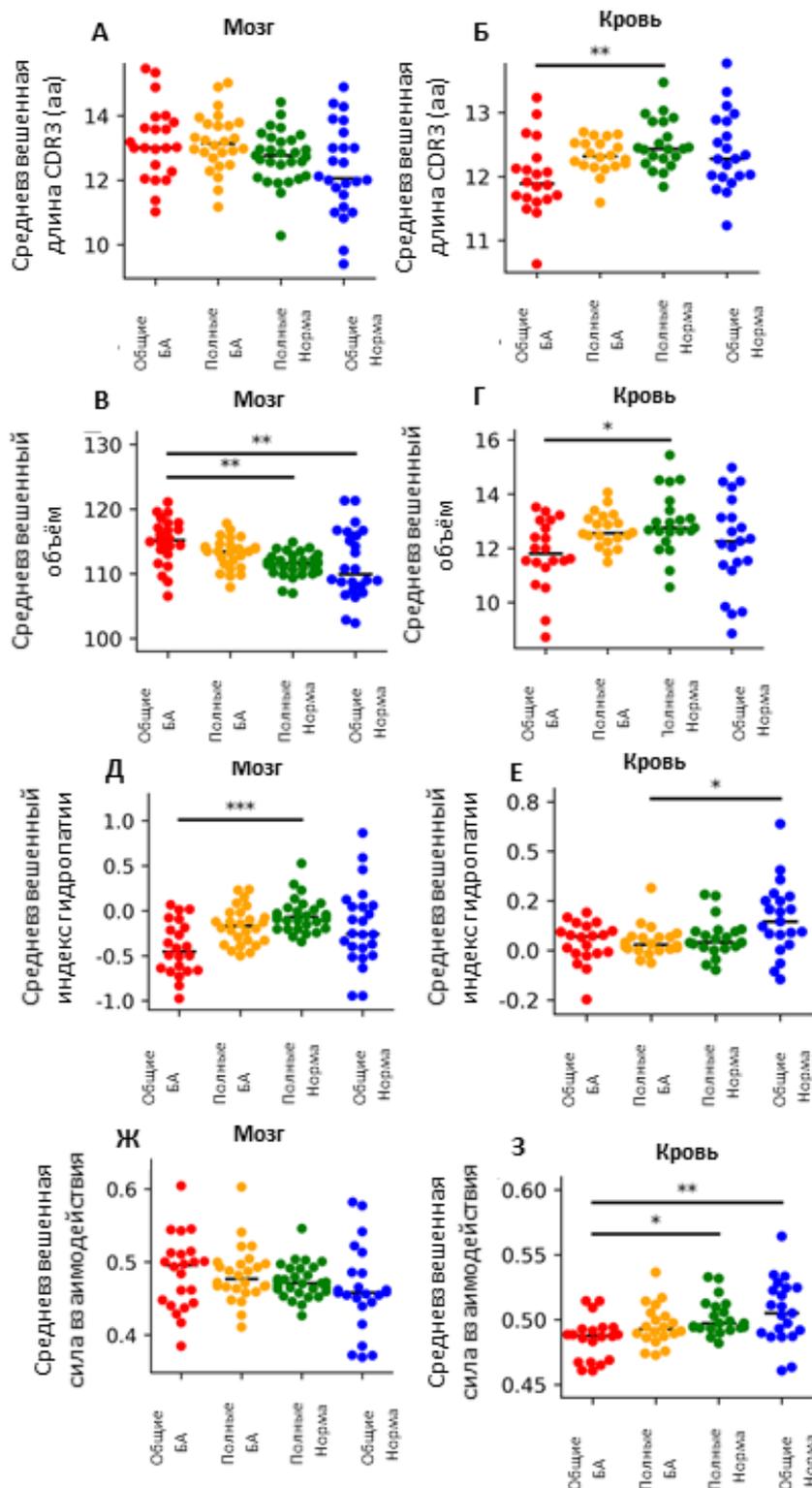


Рисунок 16 Сравнительный анализ физико-химических свойств субрепертуаров и полных репертуаров из головного мозга (А, В, Д, Ж) и периферической крови (Б, Г, Е, З). Сравнивались значения взвешенной средней длины CDR3 регионов (А, Б), взвешенного молекулярного объема, нормализованного на длину CDR3 региона (В, Г) взвешенного индекса гидропатии, нормализованного на длину CDR3 региона (Д, Е), и взвешенной потенциальной силы взаимодействия, нормализованной на длину CDR3 региона (Ж, З) между субрепертуарами, состоящими из клонотипов, общих для БА, полными репертуарами БА, полными репертуарами нормы и субрепертуарами общих клонотипов для нормы. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

На третьем этапе проводится кластерный анализ субрепертуаров по выбранным физико-химическим характеристикам. Для получения р-значений используется пермутационный тест. Анализируются параметры сегрегации БА-ассоциированных клонотипов по сравнению с «Общими для нормы» и полными репертуарами БА и нормы. Исходя из наших данных, субрепертуары, состоящие из «Общих для БА» клонотипов значимо сегрегированы относительно всех трех групп сравнения (Рисунок 17).

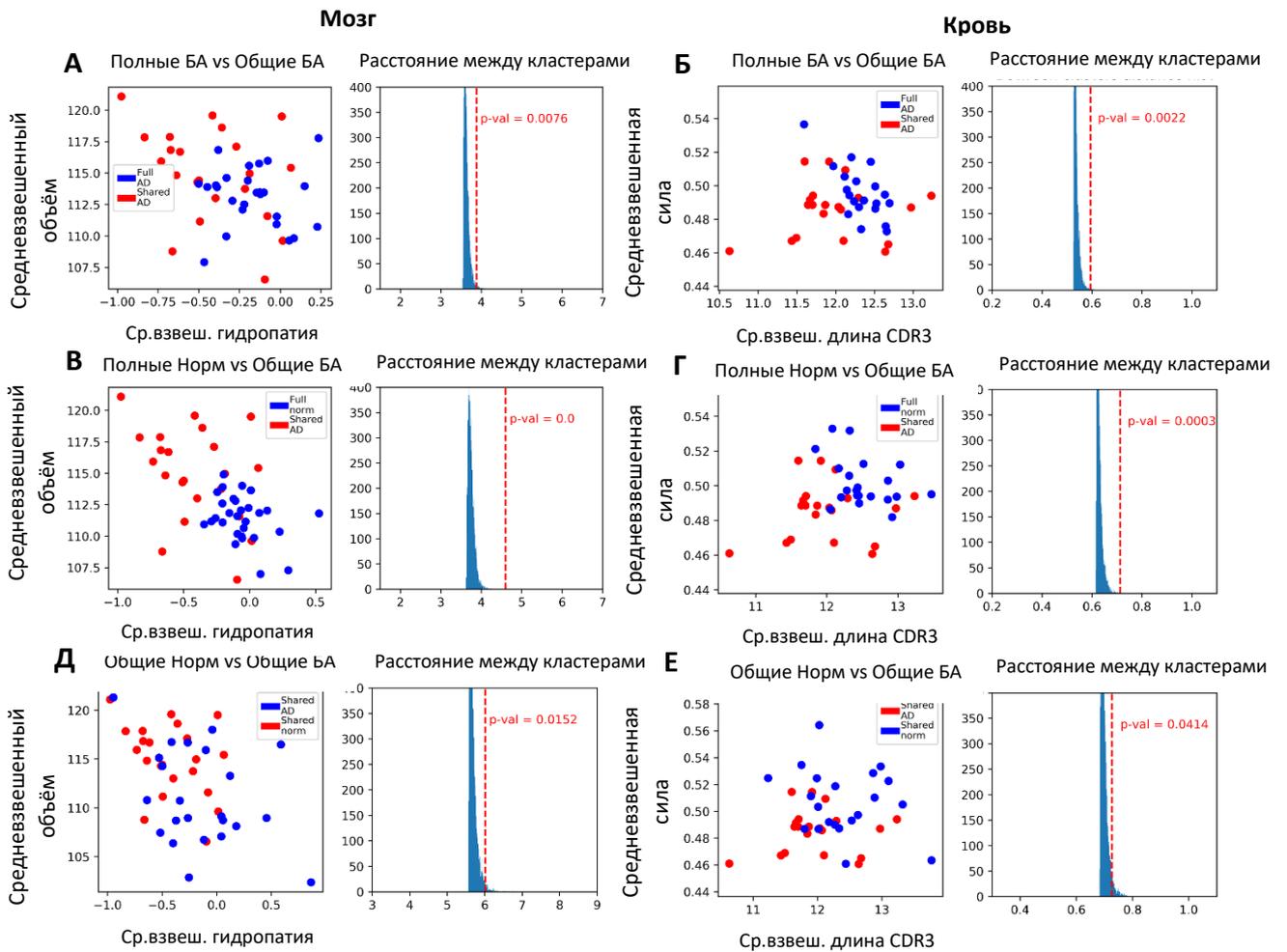


Рисунок 17 Визуализация результатов кластерного анализа в сравнении физико-химических свойств субрепертуаров, общих для пациентов с БА, с полными репертуарами БА (А, Б) и нормы (В, Г), а также субрепертуарами, общими для доноров из контрольной группы (Д, Е). Для каждого сравнения представлены два графика: диаграмма распределения репертуаров по выбранным физико-химическим свойствам (красным обозначены репертуары БА, синим - нормы) и гистограмма с результатами пермутационного теста для среднего расстояния между кластерами (красной пунктирной линией указаны экспериментальные значения, р-значения указаны для 10000 пермутаций).

На четвертом, заключительном, этапе анализа устанавливаются пороговые значения для выбранных характеристик и отбираются все клонотипы из изначальных репертуаров для сравнения частот клонотипов с заданными физико-химическими свойствами между группами больных и условно здоровых доноров. Таким образом, предполагая, что выбранные свойства CDR3 регионов определяют сродство к антигенам, ассоциированным с болезнью, сравниваются частоты клонотипов с выбранными свойствами, куда входят не только последовательности, встретившиеся у нескольких больных (что является редким событием), но и все уникальные клонотипы. Были использованы в качестве пороговых значений медианы каждого свойства в полных репертуарах нормы: нормализованный на длину CDR3 индекс гидропатии менее -0.066, нормализованный на длину CDR3 молекулярный объем более 111.59 Å³ для репертуаров головного мозга и длина CDR3 менее 13 аминокислот и нормализованная на длину CDR3 потенциальная сила взаимодействия менее 0.497 для репертуаров крови. В результате сравнения частот клонотипов с выбранными характеристиками в изначальных полных репертуарах (которое в том числе включали TRGV9-TRGJP клоны) между донорами с БА и контрольной группой, подобранной по возрасту и полу, было показано, что частоты этих клонотипов были значимо выше в группе больных, как на образцах головного мозга ($p = 0.003$), так и на образцах крови ($p = 0.003$). Результаты заключительного этапа анализа представлены на Рисунке 18. Список отобранных в результате данного анализа клонотипов представлен в Приложении 2.

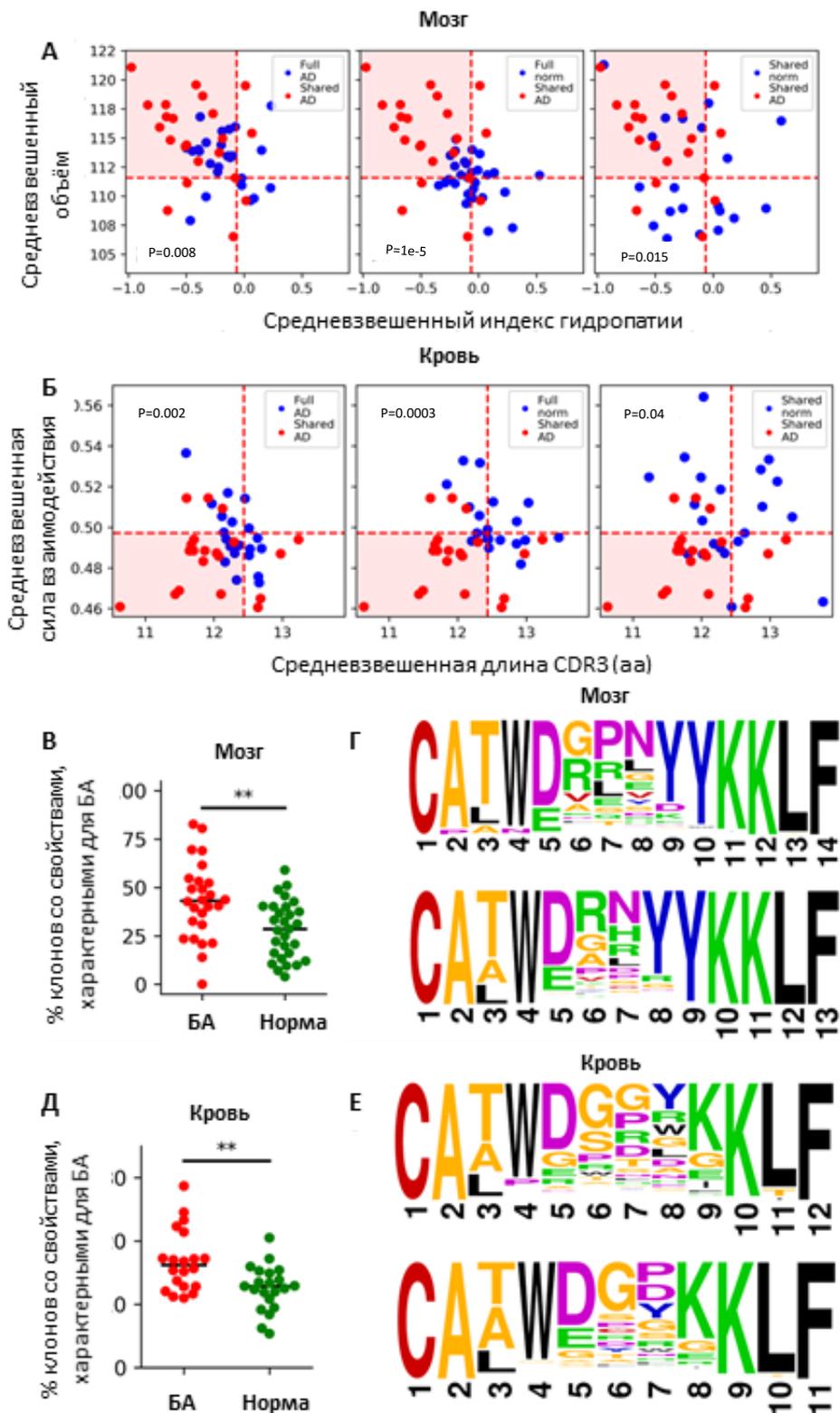


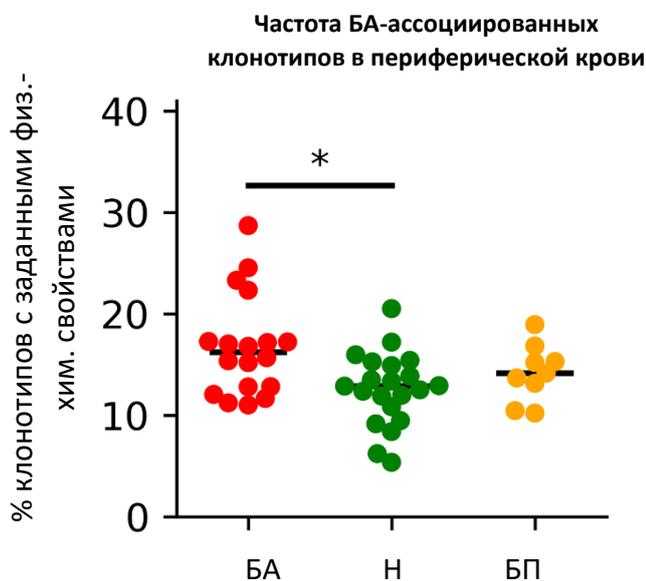
Рисунок 18 Результаты поиска клонотипов TRG, ассоциированных с болезнью Альцгеймера. Кластерный анализ TRG субрепертуаров «общих для БА» (красные точки) показал статистически значимую сепарацию от (слева направо) полных репертуаров БА и Нормы и субрепертуаров «общих для Нормы» (синие точки). В результате были выбраны пороговые значения (отмечены красной пунктирной линией) параметров, отличающих группу клонотипов общих для БА: молекулярный объем и индекс гидропатии для

репертуаров головного мозга (А); длина CDR3 и потенциальная сила взаимодействия для репертуаров периферической крови (Б). Частоты клонотипов с указанными характеристиками были статистически значимо выше у пациентов с БА (В, Д). Были составлены буквенные диаграммы «Logoplot» аминокислотных последовательностей CDR3 регионов для репертуаров головного мозга (Г) и периферической крови (Е), где оранжевым цветом обозначены маленькие по объему и слабые по силе взаимодействия; красным – маленькие по объему; фиолетовым - маленькие по объему, слабые по силе взаимодействия и гидрофильные; зеленым – гидрофильные и слабые по силе взаимодействия, синим – гидрофильные аминокислоты.

В заключение была использована дополнительная выборка пациентов с болезнью Паркинсона, образцы периферической крови которых были использованы для приготовления библиотек TRG, чтобы выяснить, характерно ли увеличение описанной нами группы клонотипов исключительно для БА или и для других нейродегенеративных заболеваний. В качестве стартового материала была использована ДНК, выделенная из крови. Так как возраст пациентов влияет на состав репертуара ТКР, для сравнительного анализа необходимо использовать выборку, не отличающуюся друг от друга по возрасту. Таким образом, были проанализированы репертуары от 18 пациентов с БА (женщины/мужчины 9/9, возраст 57-80, средний возраст 71.2), 9 пациентов с БП (женщины/мужчины 7/2, возраст 57-78, средний возраст 65.4) и 21 пациента из контрольной группы (женщины/мужчины/н.у 10/10/1, возраст 55-81, средний возраст 68). Частоты клонотипов сравнивались с помощью критерия Краскела-Уоллиса с применением апостериорного теста Данна.

Частоты клонов с меньшей длиной CDR3 и с меньшей потенциальной силой взаимодействия оказались выше только у группы пациентов с БА, но не с БП, где частоты анализируемых клонотипов были на уровне контрольной группы (Рисунок 19). Таким образом, по предварительным данным, выявленные особенности репертуаров TRG больных БА характерны только для данного заболевания, но не для нейродегенеративных патологий в целом. Однако требуется увеличение выборки пациентов с БП и анализ

репертуаров индивидов с другими нейродегенеративными заболеваниями, как периферической крови, так и головного мозга, чтобы подтвердить полученные результаты.



*Рисунок 19 Сравнение частот клонотипов с заданными физико-химическими свойствами между группой пациентов с болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона и без нейродегенеративных патологий. БА- болезнь Альцгеймера, БП – болезнь Паркинсона, Н – норма. * $p < 0.05$.*

Итак, разработанный метод анализа некоторых физико-химических свойств, которые предположительно могут определять специфичность ТКР, в контексте нейродегенеративных патологий позволил выявить характерные черты репертуара TRG, ассоциированные с болезнью. В головном мозге больных с БА увеличивается количество клонов с более гидрофильными и объемными аминокислотными остатками в составе CDR3 региона TRG. Это может свидетельствовать, к примеру, об иммунном ответе на липидные аутоантигены (как известно, $\gamma\delta$ T-клетки способны распознавать липидные молекулы в составе комплекса CD1d). В литературе известны кристаллические структуры комплексов ТКР с сульфатидом в составе молекулы CD1d [150] и α -галактозилцерамидом в составе комплекса с CD1d [41]. Сульфатид и галактозилцерамид – два основных гликофинголипида миелиновой оболочки головного мозга, образованной

олигодендроцитами [151]. Примечательно, что количество сульфатидов в головном мозге снижается на самых ранних стадиях БА [152]. Для комплекса ТКР (клон 9С2 TRGV5) с CD1d- α -галактозилцерамидом было установлено, что именно петля CDR3 γ определяет специфичное распознавание антигена [41]. Клонотипы (последовательности CDR3 γ), приведенные в упомянутых выше исследованиях (α -галактозилцерамид: CATWDRGNPKTHYYKKLF; сульфатид: CATWDEKYKKLF и CATWDRNKKLF), отвечают критериям, по которым были отобраны БА-ассоциированные клоны из репертуаров головного мозга, то есть обладают повышенной гидрофильностью и молекулярным объемом.

Заключение

В представленной работе было проведено сравнительное исследование 165 репертуаров CDR3 регионов TRG, полученных из периферической крови и коры головного мозга индивидов с болезнью Альцгеймера, Болезнью Паркинсона и доноров без нейродегенеративных заболеваний. Для изучения данных глубокого секвенирования TRG был разработан биоинформатический метод, основой которого являлся анализ физико-химических свойств аминокислотных последовательностей CDR3 клонотипов, встречающихся у нескольких больных, но не встречающихся у здоровых.

Были обнаружены характерные особенности TRG репертуаров, связанные с тканью, возрастом и диагнозом доноров. Так, репертуары TRG из коры головного мозга человека отличались от таковых из периферической крови по частотам сегментов TRGV, гидрофильности и даже частотам некоторых TRGV9-клонотипов. Более того, отличия в частотах ДНК-репертуаров головного мозга становятся более выраженными с возрастом. Для репертуаров из периферической крови характерно уменьшение разнообразия и укорочение средней длины репертуара TRG у пожилых людей, что соотносится с литературными данными. Наконец, были выявлены клонотипы, накопление которых ассоциировано с БА, обладающие общими физико-химическими характеристиками, которые могут определять их специфичность в отношении антигенов. БА сопровождается накоплением в головном мозге перестроек, богатых гидрофильными и более объемными аминокислотными остатками, и в периферической крови - более короткими CDR3 регионами и с меньшей потенциальной силой взаимодействия.

Полученные данные можно использовать для дальнейшего поиска антигенов $\gamma\delta$ T-клеток в контексте патогенеза БА. Так как роль иммунной компоненты в нейродегенеративных заболеваниях до сих пор остается не до конца определенной, изучение реакции адаптивной иммунной системы на появление амилоидных бляшек, активацию микроглии и непосредственно гибель нейронов представляет актуальную научную задачу.

Также фундаментальный научный интерес представляет собой изучение T-клеток, выделенных из головного мозга, а именно определение их локализации, фенотипирование, исследование роли T-клеточного репертуара в реализации тканеспецифичных функций в ЦНС.

Помимо фундаментального интереса результаты, представленные в данной работе, имеют важное диагностическое значение. Дальнейшее изучение клонотипов TRG, характерных для пациентов с БА, необходимо с точки зрения поиска потенциальных новых биомаркеров для предсказания и диагностики заболевания. Необходимо оценить частоты клонотипов, ассоциированных с БА, в репертуарах доноров на разных стадиях заболевания, а также с другими нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Паркинсона и лобно-височная деменция, для определения специфичности данной субпопуляции.

Выводы

1. Получены и охарактеризованы методом глубокого секвенирования 165 репертуаров гипервариабельных регионов CDR3 гамма цепи Т-клеточного рецептора (TRG) из индивидуальных образцов периферической крови и коры головного мозга человека.
2. Выявлены отличия репертуаров TRG коры головного мозга от репертуаров периферической крови человека: для репертуаров головного мозга характерны более низкие частоты клонотипов, образованных с использованием TRGV9 сегмента и более высокие частоты TRGV2/TRGV4/TRGV8 клонотипов, а также более низкий средний индекс гидropатии.
3. Показаны изменения репертуаров TRG с возрастом: постепенное снижение разнообразия и укорочение длины последовательностей CDR3 регионов TRG в периферической крови; снижение частоты TRGV9 клонотипов и увеличение частоты TRGV2/TRGV4/TRGV8 клонотипов в репертуарах головного мозга.
4. Обнаружено накопление клонотипов с определенными физико-химическими свойствами в периферической крови или коре головного мозга пациентов с болезнью Альцгеймера, в сравнении с группой доноров без нейродегенеративных патологий или с болезнью Паркинсона.

Список литературы

1. Schwartz M., Baruch K. The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. // *EMBO J.* 2014. Vol. 33, № 1. P. 7–22.
2. Marsh S.E. et al. The adaptive immune system restrains Alzheimer's disease pathogenesis by modulating microglial function. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2016. Vol. 113, № 9. P. E1316-25.
3. Colonna M., Brioschi S. Neuroinflammation and neurodegeneration in human brain at single-cell resolution // *Nat. Rev. Immunol. Nature Research*, 2020. Vol. 20, № 2. P. 81–82.
4. Lane C.A., Hardy J., Schott J.M. Alzheimer's disease // *European Journal of Neurology*. Blackwell Publishing Ltd, 2018. Vol. 25, № 1. P. 59–70.
5. Rogaev E.I. et al. Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene // *Nature*. 1995. Vol. 376, № 6543. P. 775–778.
6. Goate A. et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease // *Nature*. Nature Publishing Group, 1991. Vol. 349, № 6311. P. 704–706.
7. Sherrington R. et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease // *Nature*. Nature Publishing Group, 1995. Vol. 375, № 6534. P. 754–760.
8. Saunders A.M. et al. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. // *Neurology*. 1993. Vol. 43, № 8. P. 1467–1472.
9. Bertram L. et al. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database // *Nat. Genet.* 2007. Vol. 39, № 1. P. 17–23.
10. Penninkilampi R., Brothers H.M., Eslick G.D. Pharmacological Agents Targeting γ -Secretase Increase Risk of Cancer and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis // *Journal of Alzheimer's Disease*. IOS Press, 2016. Vol. 53, № 4. P. 1395–1404.

11. Ransohoff R.M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. // Science. American Association for the Advancement of Science, 2016. Vol. 353, № 6301. P. 777–783.
12. Biragyn A., Aliseychik M., Rogaev E. Potential importance of B cells in aging and aging-associated neurodegenerative diseases // Semin. Immunopathol. Springer Berlin Heidelberg, 2017. Vol. 39, № 3. P. 283–294.
13. Heppner F.L., Ransohoff R.M., Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease // Nat. Rev. Neurosci. 2015. Vol. 16, № 6. P. 358–372.
14. Aliseychik M.P., Andreeva T. V., Rogaev E.I. Immunogenetic Factors of Neurodegenerative Diseases: The Role of HLA Class II // Biochem. 2018. Vol. 83, № 9. P. 1104–1116.
15. McGeer P.L., Rogers J., McGeer E.G. Inflammation, Antiinflammatory Agents, and Alzheimer's Disease: The Last 22 Years // Journal of Alzheimer's Disease. IOS Press, 2016. Vol. 54, № 3. P. 853–857.
16. Bagyinszky E. et al. Role of inflammatory molecules in the Alzheimer's disease progression and diagnosis // Journal of the Neurological Sciences. Elsevier B.V., 2017. Vol. 376. P. 242–254.
17. McManus R.M., Heneka M.T. Role of neuroinflammation in neurodegeneration: new insights // Alzheimers. Res. Ther. BioMed Central, 2017. Vol. 9, № 1. P. 14.
18. Kalyan S., Kabelitz D. Defining the nature of human $\gamma\delta$ T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. // Cell. Mol. Immunol. 2013. Vol. 10, № 1. P. 21–29.
19. Bonneville M., O'Brien R.L., Born W.K. $\gamma\delta$ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity // Nat. Rev. Immunol. Nature Publishing Group, 2010. Vol. 10, № 7. P. 467–478.
20. Dieli F. et al. Granulysin-Dependent Killing of Intracellular and Extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by V γ 9/V δ 2 T Lymphocytes // J. Infect. Dis. 2001. Vol. 184, № 8. P. 1082–1085.
21. Qin G. et al. Phosphoantigen-Expanded Human $\gamma\delta$ T Cells Display Potent Cytotoxicity against Monocyte-Derived Macrophages Infected with Human and Avian Influenza Viruses // J. Infect. Dis. 2009. Vol. 200, № 6. P. 858–865.

22. Vantourout P., Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. // *Nat. Rev. Immunol.* 2013. Vol. 13, № 2. P. 88–100.
23. Déchanet J. et al. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. // *J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation*, 1999. Vol. 103, № 10. P. 1437–1449.
24. Fujishima N. et al. Skewed T cell receptor repertoire of V δ 1+ $\gamma\delta$ T lymphocytes after human allogeneic haematopoietic stem cell transplantation and the potential role for Epstein-Barr virus-infected B cells in clonal restriction // *Clin. Exp. Immunol. Wiley/Blackwell* (10.1111), 2007. Vol. 149, № 1. P. 70–79.
25. Khairallah C. et al. $\gamma\delta$ T cells confer protection against murine cytomegalovirus (MCMV). // *PLoS Pathog. Public Library of Science*, 2015. Vol. 11, № 3. P. e1004702.
26. Sciammas R. et al. Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR-gamma delta cell. // *J. Immunol.* 1994. Vol. 152, № 11. P. 5392–5397.
27. Spencer C.T. et al. Only a subset of phosphoantigen-responsive gamma9delta2 T cells mediate protective tuberculosis immunity. // *J. Immunol. American Association of Immunologists*, 2008. Vol. 181, № 7. P. 4471–4484.
28. Sutton C.E., Mielke L.A., Mills K.H.G. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells // *Eur. J. Immunol.* 2012. Vol. 42, № 9. P. 2221–2231.
29. Cua D.J., Tato C.M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system // *Nat. Rev. Immunol.* 2010. Vol. 10, № 7. P. 479–489.
30. Conti L. et al. Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines. // *J. Immunol.* 2005. Vol. 174, № 1. P. 252–260.
31. Wen L. et al. Germinal center formation, immunoglobulin class switching, and autoantibody production driven by “non alpha/beta” T cells. // *J. Exp. Med.* 1996. Vol. 183, № 5. P. 2271–2282.
32. Brandes M., Willmann K., Moser B. Professional Antigen-Presentation Function by Human $\gamma\delta$ T Cells // *Science* (80-.). 2005. Vol. 309, № 5732.
33. Vermijlen D. et al. Distinct cytokine-driven responses of activated blood gammadelta T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy. // *J. Immunol.* 2007. Vol. 178, № 7.

- P. 4304–4314.
34. Hudspeth K. et al. Engagement of NKp30 on V β 1 T cells induces the production of CCL3, CCL4, and CCL5 and suppresses HIV-1 replication // *Blood*. 2012. Vol. 119, № 17. P. 4013–4016.
 35. Ebert L.M., Meuter S., Moser B. Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. // *J. Immunol.* 2006. Vol. 176, № 7. P. 4331–4336.
 36. Pociask D.A. et al. $\gamma\delta$ T Cells Attenuate Bleomycin-Induced Fibrosis through the Production of CXCL10 // *Am. J. Pathol.* 2011. Vol. 178, № 3. P. 1167–1176.
 37. Tagawa T. et al. Vdelta1+ gammadelta T cells producing CC chemokines may bridge a gap between neutrophils and macrophages in innate immunity during *Escherichia coli* infection in mice. // *J. Immunol.* 2004. Vol. 173, № 8. P. 5156–5164.
 38. Boismenu R. et al. Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. // *J. Immunol.* 1996. Vol. 157, № 3. P. 985–992.
 39. Matsue H., Bergstresser P.R., Takashima A. Reciprocal cytokine-mediated cellular interactions in mouse epidermis: promotion of gamma delta T-cell growth by IL-7 and TNF alpha and inhibition of keratinocyte growth by gamma IFN. // *J. Invest. Dermatol.* 1993. Vol. 101, № 4. P. 543–548.
 40. Gober H.-J. et al. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. // *J. Exp. Med.* 2003. Vol. 197, № 2. P. 163–168.
 41. Uldrich A.P. et al. CD1d-lipid antigen recognition by the $\gamma\delta$ TCR // *Nat. Immunol.* 2013. Vol. 14, № 11. P. 1137–1145.
 42. Laad a D. et al. Human gamma delta T cells recognize heat shock protein-60 on oral tumor cells. // *Int. J. Cancer.* 1999. Vol. 80, № 5. P. 709–714.
 43. Willcox C.R. et al. Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human $\gamma\delta$ T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor // *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group, 2012. Vol. 13, № 9. P. 872–879.
 44. Groh V. et al. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999. Vol. 96,

- № 12. P. 6879–6884.
45. Girardi M. et al. Regulation of Cutaneous Malignancy by gamma delta T Cells // *Science* (80-.). 2001. Vol. 294, № 5542. P. 605–609.
 46. Kabelitz D. Editorial: “Recent advances in gamma/delta T cell biology: new ligands, new functions, and new translational perspectives” // *Front. Immunol.* 2015. Vol. 6, № July. P. 4–9.
 47. Chien Y., Meyer C., Bonneville M. $\gamma\delta$ T Cells: First Line of Defense and Beyond // *Annu. Rev. Immunol.* 2014. Vol. 32, № 1. P. 121–155.
 48. Nielsen M.M., Witherden D.A., Havran W.L. $\gamma\delta$ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. // *Nat. Rev. Immunol.* NIH Public Access, 2017. Vol. 17, № 12. P. 733–745.
 49. Ke Y. et al. Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance. // *J. Immunol.* American Association of Immunologists, 1997. Vol. 158, № 8. P. 3610–3618.
 50. Locke N.R. et al. TCR gamma delta intraepithelial lymphocytes are required for self-tolerance. // *J. Immunol.* American Association of Immunologists, 2006. Vol. 176, № 11. P. 6553–6559.
 51. Davis M.M., Bjorkman P.J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition // *Nature.* 1988. Vol. 334, № 6181. P. 395–402.
 52. van Dongen J.J.M. et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. // *Leukemia.* 2003. Vol. 17, № 12. P. 2257–2317.
 53. Ярилин А.А. Иммунология // *Иммунология: учебник.* М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. P. 553–588 p.
 54. Sherwood A.M. et al. Deep sequencing of the human TCR γ and TCR β repertoires suggests that TCR β rearranges after $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell commitment. // *Sci. Transl. Med.* American Association for the Advancement of Science, 2011. Vol. 3, № 90. P. 90ra61.
 55. Born W.K., Reardon C.L., O’Brien R.L. The function of $\gamma\delta$ T cells in innate immunity // *Curr. Opin. Immunol.* Elsevier Current Trends, 2006. Vol. 18, № 1. P. 31–38.

56. Ravens S. et al. Human $\gamma\delta$ T cells are quickly reconstituted after stem-cell transplantation and show adaptive clonal expansion in response to viral infection // *Nat. Immunol.* Nature Publishing Group, 2017. Vol. 18, № 4. P. 393–401.
57. Kallemeijn M.J. et al. Next-Generation Sequencing Analysis of the Human TCR $\gamma\delta$ + T-Cell Repertoire Reveals Shifts in V γ - and V δ -Usage in Memory Populations upon Aging // *Front. Immunol.* Frontiers, 2018. Vol. 9. P. 448.
58. Dimova T. et al. Effector V γ 9V δ 2 T cells dominate the human fetal $\gamma\delta$ T-cell repertoire. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2015. Vol. 112, № 6. P. E556-65.
59. Thurnher M., Nussbaumer O., Gruenbacher G. Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as antitumor agents. // *Clin. Cancer Res.* 2012. Vol. 18, № 13. P. 3524–3531.
60. Vavassori S. et al. Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human $\gamma\delta$ T cells // *Nat. Immunol.* 2013. Vol. 14, № 9. P. 908–916.
61. Sandstrom A. et al. The Intracellular B30.2 Domain of Butyrophilin 3A1 Binds Phosphoantigens to Mediate Activation of Human V γ 9V δ 2 T Cells // *Immunity.* 2014. Vol. 40, № 4. P. 490–500.
62. Riaño F. et al. V γ 9V δ 2 TCR-activation by phosphorylated antigens requires butyrophilin 3 A1 (*BTN3A1*) and additional genes on human chromosome 6 // *Eur. J. Immunol.* 2014. Vol. 44, № 9. P. 2571–2576.
63. Wingren C. et al. Crystal structure of a gammadelta T cell receptor ligand T22: a truncated MHC-like fold. // *Science.* 2000. Vol. 287, № 5451. P. 310–314.
64. Hampl J. et al. The specificity of a weak gamma delta TCR interaction can be modulated by the glycosylation of the ligand. // *J. Immunol.* 1999. Vol. 163, № 1. P. 288–294.
65. Bai L. et al. The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant V δ 1 TCR // *Eur. J. Immunol.* 2012. Vol. 42, № 9. P. 2505–2510.
66. Wu J., Groh V., Spies T. T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells. // *J. Immunol.* 2002. Vol. 169, № 3. P. 1236–1240.
67. Groh V. et al. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. // *Science.* 1998. Vol. 279, № 5357. P. 1737–1740.

68. Kong Y. et al. The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCR $\gamma/2$ and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCR and NKG2D // *Blood*. 2009. Vol. 114, № 2. P. 310–317.
69. Porcelli S. et al. Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human CD4–CD8⁺ cytolytic T lymphocyte // *Nature*. 1989. Vol. 341, № 6241. P. 447–450.
70. Vincent M.S. et al. Lyme arthritis synovial gamma delta T cells respond to *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and lipidated hexapeptides. // *J. Immunol*. 1998. Vol. 161, № 10. P. 5762–5771.
71. Zeng X. et al. $\gamma\delta$ T Cells Recognize a Microbial Encoded B Cell Antigen to Initiate a Rapid Antigen-Specific Interleukin-17 Response // *Immunity*. 2012. Vol. 37, № 3. P. 524–534.
72. Constant P. et al. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. // *Science*. 1994. Vol. 264, № 5156. P. 267–270.
73. Scotet E. et al. Tumor recognition following V γ 9V δ 2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. // *Immunity*. Elsevier, 2005. Vol. 22, № 1. P. 71–80.
74. Bruder J. et al. Target Specificity of an Autoreactive Pathogenic Human $\gamma\delta$ -T Cell Receptor in Myositis // *J. Biol. Chem*. 2012. Vol. 287, № 25. P. 20986–20995.
75. Rust C.J.J. et al. Specific recognition of staphylococcal enterotoxin A by human T cells bearing receptors with the V γ 9 region // *Nature*. 1990. Vol. 346, № 6284. P. 572–574.
76. Guo Y. et al. Human T-cell recognition of *Listeria monocytogenes*: recognition of listeriolysin O by TcR alpha beta + and TcR gamma delta + T cells. // *Infect. Immun*. 1995. Vol. 63, № 6. P. 2288–2294.
77. Gioia C. et al. Different Cytokine Production and Effector/Memory Dynamics of $\alpha\beta$ + or $\gamma\delta$ + T-Cell Subsets in the Peripheral Blood of Patients with Active Pulmonary Tuberculosis // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol*. 2003. Vol. 16, № 3. P. 247–252.
78. Crowley M.P. et al. The recognition of the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule, T10, by the gammadelta T cell, G8. // *J. Exp. Med*. 1997. Vol. 185, № 7. P. 1223–1230.
79. Shin S. et al. Antigen Recognition Determinants of T Cell Receptors // *Science* (80-.). 2005. Vol. 308, № 5719. P. 252–255.

80. Matis L.A. et al. Structure and specificity of a class II MHC alloreactive gamma delta T cell receptor heterodimer. // *Science*. 1989. Vol. 245, № 4919. P. 746–749.
81. Johnson R.M. et al. A murine CD4-, CD8- T cell receptor-gamma delta T lymphocyte clone specific for herpes simplex virus glycoprotein I. // *J. Immunol.* 1992. Vol. 148, № 4. P. 983–988.
82. Born W.K. et al. Hybridomas expressing gammadelta T-cell receptors respond to cardiolipin and beta2-glycoprotein 1 (apolipoprotein H). // *Scand. J. Immunol.* 2003. Vol. 58, № 3. P. 374–381.
83. Zhang L. et al. Gamma delta T cell receptors confer autonomous responsiveness to the insulin-peptide B:9-23 // *J. Autoimmun.* 2010. Vol. 34, № 4. P. 478–484.
84. Stervbo U. et al. Age dependent differences in the kinetics of $\gamma\delta$ T cells after influenza vaccination. // *PLoS One. Public Library of Science*, 2017. Vol. 12, № 7. P. e0181161.
85. Caccamo N. et al. Sex-specific phenotypical and functional differences in peripheral human V 9/V 2 T cells // *J. Leukoc. Biol.* 2006. Vol. 79, № 4. P. 663–666.
86. Cairo C. et al. Impact of age, gender, and race on circulating $\gamma\delta$ T cells. // *Hum. Immunol. NIH Public Access*, 2010. Vol. 71, № 10. P. 968–975.
87. Hviid L. et al. High frequency of circulating gamma delta T cells with dominance of the $v(\delta)1$ subset in a healthy population. // *Int. Immunol.* 2000. Vol. 12, № 6. P. 797–805.
88. United Nations, Department of Economic and Social Affairs P.D. *World Population Prospects: The 2017 Revision, Volume II: Demographic Profiles*. 2017.
89. GBD 2015 Neurological Disorders Collaborator Group V.L. et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. // *Lancet. Neurol. Elsevier*, 2017. Vol. 16, № 11. P. 877–897.
90. De Strooper B., Karran E. *The Cellular Phase of Alzheimer's Disease* // *Cell. Cell Press*, 2016. Vol. 164, № 4. P. 603–615.
91. Verheijen J., Sleegers K. *Understanding Alzheimer Disease at the Interface between Genetics and Transcriptomics* // *Trends Genet. Elsevier Current Trends*, 2018.
92. Bateman R.J. et al. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. // *N. Engl. J. Med. NIH Public Access*, 2012. Vol. 367, № 9. P. 795–804.

93. Korovaitseva G.I. et al. [Genetic association between the apolipoprotein E (ApoE) gene alleles and various forms of Alzheimer's disease]. // *Genetika*. 2001. Vol. 37, № 4. P. 529–535.
94. Karch C.M., Cruchaga C., Goate A.M. Alzheimer's Disease Genetics: From the Bench to the Clinic // *Neuron*. Cell Press, 2014. Vol. 83, № 1. P. 11–26.
95. Van Cauwenberghe C., Van Broeckhoven C., Sleegers K. The genetic landscape of Alzheimer disease: clinical implications and perspectives // *Genet. Med.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 18, № 5. P. 421–430.
96. Papassotiropoulos A. et al. Cholesterol 25-Hydroxylase on Chromosome 10q Is a Susceptibility Gene for Sporadic Alzheimer's Disease // *Neurodegener. Dis.* 2005. Vol. 2, № 5. P. 233–241.
97. Golenkina S.A. et al. [Analysis of clusterin gene (CLU/APOJ) polymorphism in Alzheimer's disease patients and in normal cohorts from Russian populations]. // *Mol. Biol. (Mosk)*. Vol. 44, № 4. P. 620–626.
98. Dexter D.T., Jenner P. Parkinson disease: From pathology to molecular disease mechanisms // *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc., 2013. Vol. 62. P. 132–144.
99. Jenner P., Olanow C.W. The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease // *Neurology*. Lippincott Williams and Wilkins, 2006. Vol. 66, № 10 SUPPL. 4.
100. Spillantini M.G. et al. α -Synuclein in Lewy bodies // *Nature*. Nature Publishing Group, 1997. Vol. 388, № 6645. P. 839–840.
101. van der Brug M.P. et al. Parkinson's disease: From human genetics to clinical trials. // *Sci. Transl. Med.* American Association for the Advancement of Science, 2015. Vol. 7, № 305. P. 205ps20.
102. Lill C.M. Genetics of Parkinson's disease // *Mol. Cell. Probes*. Academic Press, 2016. Vol. 30, № 6. P. 386–396.
103. Richartz-Salzburger E. et al. Altered lymphocyte distribution in Alzheimer's disease. // *J. Psychiatr. Res.* Elsevier, 2007. Vol. 41, № 1–2. P. 174–178.
104. Wyss-Coray T. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response?

105. Hirsch E.C., Hunot S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? // *Lancet Neurol.* 2009. Vol. 8, № 4. P. 382–397.
106. Sims R. et al. Rare coding variants in *PLCG2*, *ABI3*, and *TREM2* implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease // *Nat. Genet.* 2017. Vol. 49, № 9. P. 1373–1384.
107. Simón-Sánchez J. et al. Genome-wide association study confirms extant PD risk loci among the Dutch. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2011. Vol. 19, № 6. P. 655–661.
108. Prinz M., Priller J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease // *Nat. Neurosci.* Nature Publishing Group, 2017. Vol. 20, № 2. P. 136–144.
109. Li Q., Barres B.A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease // *Nat. Rev. Immunol.* Nature Publishing Group, 2017. Vol. 18, № 4. P. 225–242.
110. Hopperton K.E. et al. Markers of microglia in post-mortem brain samples from patients with Alzheimer's disease: a systematic review // *Mol. Psychiatry.* Nature Publishing Group, 2018. Vol. 23, № 2. P. 177–198.
111. Hayes G.M., Woodroffe M.N., Cuzner M.L. Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter. // *J. Neurol. Sci.* 1987. Vol. 80, № 1. P. 25–37.
112. Harrison I.F., Smith A.D., Dexter D.T. Pathological histone acetylation in Parkinson's disease: Neuroprotection and inhibition of microglial activation through SIRT 2 inhibition // *Neurosci. Lett.* Elsevier, 2018. Vol. 666. P. 48–57.
113. Sanchez-Guajardo V., Tentillier N., Romero-Ramos M. The relation between α -synuclein and microglia in Parkinson's disease: Recent developments // *Neuroscience.* Pergamon, 2015. Vol. 302. P. 47–58.
114. Bullido M.J. et al. A TAP2 genotype associated with Alzheimer's disease in APOE4 carriers. // *Neurobiol. Aging.* Elsevier, 2007. Vol. 28, № 4. P. 519–523.
115. Neff F. et al. Immunotherapy and naturally occurring autoantibodies in neurodegenerative disorders // *Autoimmun. Rev.* Elsevier, 2008. Vol. 7, № 6. P. 501–507.
116. Papachroni K.K. et al. Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease // *J. Neurochem.* Wiley/Blackwell (10.1111), 2006. Vol. 101, № 3. P. 749–756.
117. Marsh S.E. et al. The adaptive immune system restrains Alzheimer's disease pathogenesis by modulating microglial function.

118. Bryson K.J., Lynch M.A. Linking T cells to Alzheimer's disease: from neurodegeneration to neurorepair // *Curr. Opin. Pharmacol.* Elsevier, 2016. Vol. 26. P. 67–73.
119. Brochard V. et al. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease // *J. Clin. Invest.* American Society for Clinical Investigation, 2008. Vol. 119, № 1.
120. Sweeney M.D., Sagare A.P., Zlokovic B. V. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders // *Nat. Rev. Neurol.* Nature Publishing Group, 2018. Vol. 14, № 3. P. 133–150.
121. Derkow K. et al. Microglia Induce Neurotoxic IL-17+ $\gamma\delta$ T Cells Dependent on TLR2, TLR4, and TLR9 Activation // *PLoS One* / ed. Linker R.A. Public Library of Science, 2015. Vol. 10, № 8. P. e0135898.
122. Welte T. et al. Role of two distinct gammadelta T cell subsets during West Nile virus infection. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* The Oxford University Press, 2008. Vol. 53, № 2. P. 275–283.
123. Benakis C. et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells // *Nat. Med.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 22, № 5. P. 516–523.
124. Owens G.C. et al. Evidence for the involvement of gamma delta T cells in the immune response in Rasmussen encephalitis. // *J. Neuroinflammation.* BioMed Central, 2015. Vol. 12. P. 134.
125. Blink S.E. et al. $\gamma\delta$ T Cell Subsets Play Opposing Roles in Regulating Experimental Autoimmune Encephalomyelitis 1 // *Cell Immunol.* 2014. Vol. 290, № 1. P. 39–51.
126. Selmaj K., Brosnan C.F., Raine C.S. Colocalization of lymphocytes bearing v δ T-cell receptor and heat shock protein hsp65' oligodendrocytes in multiple sclerosis // *Immunology.* 1991. Vol. 88. P. 6452–6456.
127. Freedman M.S. et al. Peripheral blood gamma-delta T cells lyse fresh human brain-derived oligodendrocytes. // *Ann. Neurol.* 1991. Vol. 30, № 6. P. 794–800.
128. Cooper J.C. et al. Unusual T cell receptor phenotype V gene usage of T cells in a line derived from the peripheral nerve of a patient with Guillain-Barré syndrome. 2000. P. 522–524.

129. Yamamoto T. et al. Abnormal Expansion of Peripheral $\gamma\delta$ T Cells in Patients with Neurologic Disorders. 1997. Vol. 166, № 11. P. 157–166.
130. Mu N. et al. Increased frequency of CD8 positive γ/δ T-lymphocytes (CD8 + c / d +) in unmedicated schizophrenic patients : relation to impairment of the blood – brain barrier and HLA-DPA * 02011. 1998. Vol. 32. P. 69–71.
131. Gusev F.E. et al. Chromatin profiling of cortical neurons identifies individual epigenetic signatures in schizophrenia // *Transl. Psychiatry*. Nature Publishing Group, 2019. Vol. 9, № 1.
132. NYBB [Electronic resource]. URL: <http://nybb.hs.columbia.edu/> (accessed: 13.08.2018).
133. Oregon Brain Bank | OHSU Dept of Pathology | OHSU [Electronic resource]. URL: <https://www.ohsu.edu/xd/education/schools/school-of-medicine/departments/clinical-departments/pathology/research/oregon-brain-bank.cfm> (accessed: 13.08.2018).
134. Brain Bank and Biorepository | Duke Department of Neurology [Electronic resource]. URL: <https://neurology.duke.edu/research/research-centers/joseph-and-kathleen-bryan-alzheimers-disease-research-center/brain-bank> (accessed: 13.08.2018).
135. Di Pietro F. et al. Genomic DNA extraction from whole blood stored from 15- to 30-years at -20°C by rapid phenol–chloroform protocol: A useful tool for genetic epidemiology studies // *Mol. Cell. Probes*. 2011. Vol. 25, № 1. P. 44–48.
136. Primer 3 [Electronic resource]. URL: <http://www.primer3.org/> (accessed: 13.08.2018).
137. Bolotin D.A. et al. MiXCR: software for comprehensive adaptive immunity profiling // *Nat. Methods*. 2015. Vol. 12, № 5. P. 380–381.
138. Shugay M. et al. VDJtools: Unifying Post-analysis of T Cell Receptor Repertoires // *PLOS Comput. Biol.* / ed. Gardner P.P. 2015. Vol. 11, № 11. P. e1004503.
139. Britanova O. V et al. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. // *J. Immunol.* 2014. Vol. 192, № 6. P. 2689–2698.
140. Kallemeijn M.J. et al. Next-Generation Sequencing Analysis of the Human TCR $\gamma\delta$ + T-Cell Repertoire Reveals Shifts in V γ - and V δ -Usage in Memory Populations upon Aging // *Front. Immunol. Frontiers*, 2018. Vol. 9. P. 448.
141. Egorov E.S. et al. The Changing Landscape of Naive T Cell Receptor Repertoire With

- Human Aging. // Front. Immunol. Frontiers Media SA, 2018. Vol. 9. P. 1618.
142. Derecki N.C. et al. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4 // J. Exp. Med. 2010. Vol. 207, № 5. P. 1067–1080.
 143. Lopes Pinheiro M.A. et al. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke // Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 2016. Vol. 1862, № 3. P. 461–471.
 144. Adams E.J., Gu S., Luoma A.M. Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition // Cell. Immunol. Elsevier Inc., 2015. Vol. 296, № 1. P. 31–40.
 145. Willcox C.R., Davey M.S., Willcox B.E. Development and Selection of the Human V γ 9V δ 2+ T-Cell Repertoire. // Front. Immunol. Frontiers Media SA, 2018. Vol. 9. P. 1501.
 146. Lee M. et al. Preferential Infiltration of Unique V γ 9J γ 2-V δ 2 T Cells Into Glioblastoma Multiforme // Front. Immunol. Frontiers Media S.A., 2019. Vol. 10, № MAR. P. 555.
 147. Pommié C. et al. IMGT standardized criteria for statistical analysis of immunoglobulin V-REGION amino acid properties // J. Mol. Recognit. 2004. Vol. 17, № 1. P. 17–32.
 148. Kosmrlj A. et al. How the thymus designs antigen-specific and self-tolerant T cell receptor sequences. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences, 2008. Vol. 105, № 43. P. 16671–16676.
 149. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein // J. Mol. Biol. J Mol Biol, 1982. Vol. 157, № 1. P. 105–132.
 150. Luoma A.M. et al. Crystal structure of V δ 1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human $\gamma\delta$ T cells. // Immunity. NIH Public Access, 2013. Vol. 39, № 6. P. 1032–1042.
 151. Boggs J.M. et al. Participation of galactosylceramide and sulfatide in glycosynapses between oligodendrocyte or myelin membranes // FEBS Letters. 2010. Vol. 584, № 9. P. 1771–1778.
 152. Han X. The Pathogenic Implication of Abnormal Interaction Between Apolipoprotein E Isoforms, Amyloid-beta Peptides, and Sulfatides in Alzheimer's Disease // Mol. Neurobiol. 2010. Vol. 41, № 2–3. P. 97–106.

Благодарности

Особую благодарность выражаю Евгению Ивановичу Робаеву за идейное сопровождение работы, ценные научные рекомендации, помощь в планировании и организации экспериментов, поддержку на всех этапах рабочего процесса.

Отдельно хочу выразить признательность заведующему кафедрой иммунологии МГУ Сергею Артуровичу Недоспасову за развитие научного мышления и получение необходимой базы научных знаний, а также за личное участие и помощь во время выполнения работы.

Спасибо Татьяне Владимировне Андреевой и Анастасии Петровне Григоренко за обучение новым методам, помощи в секвенировании и дружественную рабочую обстановку. Выношу благодарность Федору Гусеву и Антону Патрикееву за помощь в биоинформатике и статистике при анализе данных, конструктивные обсуждения и работу над публикациями. Также благодарю Андрея Манахова и других сотрудников лаборатории за помощь и поддержку в процессе работы.

Хочу поблагодарить Арию Бирагина, заведующего лабораторией молекулярной биологии и иммунологии в национальном институте старения США, за ценные практические рекомендации и совместную работу над публикациями.

Я признательна Виктору Степановичу Тарабыкину (институт клеточной биологии и нейробиологии клиники Шарите в Германии) за возможность освоить методы микроскопии в его лаборатории.

Также хочу выразить слова благодарности преподавателям кафедры иммунологии биологического факультета МГУ за необходимые фундаментальные и прикладные знания, конструктивную критику и помощь в организации.

Я выражаю благодарность моей семье за поддержку, терпение и возможность работать в разных лабораториях.

Приложение 1

Таблица 7 Образцы, использованные для приготовления библиотек для глубокого секвенирования CDR3 регионов TRG

Ткань	Банк Ткани	ДНК/ РНК	Образец	Диагноз	Возраст	Пол	Функциональные CDR3 клоны
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A1135	БА	48	Жен	5102
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A1138	БА	57	Жен	5095
Кровь	Иоген РАН	ДНК	631	БА	59	Жен	4049
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A1097	БА	59	Муж	3788
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A777	БА	61	Муж	4483
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A882	БА	63	Жен	10210
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A978	БА	69	Жен	5763
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A1094	БА	71	Муж	3343
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A1036	БА	73	Муж	4551
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A679	БА	73	Жен	5010
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A1092	БА	74	Муж	5098
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A1045	БА	76	Муж	5569
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A984	БА	76	Жен	5019
Кровь	Иоген РАН	ДНК	846	БА	77	Жен	3900
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A1080	БА	77	Муж	4531
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A846	БА	77	Жен	4527
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A949_2	БА	78	Жен	3885
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A1029	БА	79	Жен	3523
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A1111	БА	79	Муж	2662
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A1019	БА	80	Муж	3056
Кровь	Иоген РАН	ДНК	1086	БА	82	Муж	2476
Кровь	Иоген РАН	ДНК	A1159	БА	82	Жен	5136
Кровь	Иоген РАН	ДНК	1101	БА	94	Муж	2491
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PN243	Норма	25	Муж	5292
Кровь	Иоген РАН	ДНК	NB13	Норма	28	Жен	5985
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PN289	Норма	34	Жен	4459
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PN73	Норма	34	Муж	6251
Кровь	Иоген РАН	ДНК	NB25	Норма	40	Жен	8360
Кровь	Иоген РАН	ДНК	NB26	Норма	46	Жен	8420
Кровь	Иоген РАН	ДНК	ND69	Норма	48	Жен	5510
Кровь	Иоген РАН	ДНК	ND35	Норма	49	Жен	5451
Кровь	Иоген РАН	ДНК	138	Норма	50	Жен	4299
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PN194	Норма	50	Муж	8627
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PN96	Норма	50	Жен	6004
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PN197	Норма	53	Муж	7926
Кровь	Иоген РАН	ДНК	114	Норма	55	Жен	7519
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PN247	Норма	59	Муж	3924
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PN274	Норма	59	Жен	6532
Кровь	Иоген РАН	ДНК	141	Норма	60	Жен	3852
Кровь	Иоген РАН	ДНК	O16	Норма	60	Муж	8787
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PN302	Норма	62	Жен	4688

Кровь	Иоген РАН	ДНК	NB3	Норма	64	Муж	4405
Кровь	Иоген РАН	ДНК	NL3	Норма	65	Жен	3103
Кровь	Иоген РАН	ДНК	NL3-О	Норма	65	Жен	3055
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PN259	Норма	65	Жен	7962
Кровь	Иоген РАН	ДНК	N432	Норма	66	Жен	4306
Кровь	Иоген РАН	ДНК	158	Норма	67	Жен	1237
Кровь	Иоген РАН	ДНК	ONK255	Норма	67	Муж	4068
Кровь	Иоген РАН	ДНК	NB17	Норма	68	Муж	4058
Кровь	Иоген РАН	ДНК	N423	Норма	69	Муж	4023
Кровь	Иоген РАН	ДНК	155	Норма	70	unknow n	6028
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PN147	Норма	71	Муж	5789
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PN139	Норма	72	Жен	3946
Кровь	Иоген РАН	ДНК	NB19	Норма	73	Муж	3598
Кровь	Иоген РАН	ДНК	NL-7	Норма	73	Муж	3899
Кровь	Иоген РАН	ДНК	116	Норма	74	Жен	4779
Кровь	Иоген РАН	ДНК	ONK171	Норма	74	Муж	1766
Кровь	Иоген РАН	ДНК	NL-10	Норма	76	Муж	5411
Кровь	Иоген РАН	ДНК	N436	Норма	80	Муж	1254
Кровь	Иоген РАН	ДНК	L20 (20)	Норма	81	Жен	5659
Кровь	Иоген РАН	ДНК	L4 (4)	Норма	85	Жен	4059
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PN221	Норма	86	Муж	3408
Кровь	Иоген РАН	ДНК	78	Норма	91	Жен	3693
Кровь	Иоген РАН	ДНК	86	Норма	94	Муж	2399
Кровь	Иоген РАН	ДНК	L88	Норма	106	Жен	3355
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK10	PK	39	Муж	7186
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK19	PK	41	Жен	12104
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK33	PK	42	Жен	5393
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK25	PK	44	Жен	4488
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK34	PK	49	Муж	4634
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK23	PK	53	Жен	10296
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK17	PK	54	Жен	6601
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK32	PK	57	Муж	3607
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK14	PK	59	Жен	7985
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK5	PK	63	Муж	5780
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK6	PK	63	Жен	4912
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK26	PK	64	Жен	6503
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK13	PK	67	Жен	6471
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK9	PK	67	Жен	3739
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK31	PK	71	Жен	4646
Кровь	Иоген РАН	ДНК	PK22	PK	78	Жен	4114
Мозг Лобная доля	Иоген РАН	ДНК	639br	БА	72	Муж	57
Мозг Лобная доля	Иоген РАН	ДНК	254br	БА	75	Муж	167
Мозг Лобная доля	Иоген РАН	ДНК	143br	БА	79	Муж	104

Мозг Лобная доля	Иоген РАН	PHK	1102	БА	86	Жен	45
Мозг Лобная доля	Иоген РАН	PHK	1340	БА	87	Жен	63
Мозг Лобная доля	Duke University Bank	PHK	623	БА	89	Жен	53
Мозг Лобная доля	Duke University Bank	ДНК	151br	БА	>90	Жен	62
Мозг Лобная доля	Duke University Bank	ДНК	688br	Норма	63	Муж	297
Мозг Лобная доля	Duke University Bank	ДНК	981br	Норма	74	Жен	94
Мозг Лобная доля	Duke University Bank	PHK	196	Норма	75	Муж	47
Мозг Лобная доля	Duke University Bank	ДНК	795br	Норма	81	Муж	125
Мозг Лобная доля	Duke University Bank	ДНК	1169br	Норма	88	Муж	55
Мозг Лобная доля	Duke University Bank	PHK	425	Норма	>90	Жен	117
Мозг Лобная доля	Duke University Bank	ДНК	425br	Норма	>90	Жен	69
Мозг Лобная доля	Maryland Collection	PHK	24sz	Норма	21	Муж	143
Мозг Лобная доля	Maryland Collection	PHK	22sz	Норма	30	Муж	64
Мозг Лобная доля	Maryland Collection	PHK	28sz	Норма	38	Муж	74
Мозг Лобная доля	Maryland Collection	PHK	6sz	Норма	39	Муж	35
Мозг Лобная доля	Maryland Collection	PHK	2sz	Норма	61	Муж	103
Мозг Лобная доля	Maryland Collection	PHK	8sz	Норма	69	Жен	92
Мозг Лобная доля	Maryland Collection	PHK	16sz	Норма	75	Муж	88
Мозг Лобная доля	Maryland Collection	PHK	12sz	Норма	84	Муж	77
Мозг Лобная доля	Maryland Collection	PHK	26sz	Норма	90	Муж	65
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	249	БА	62	Жен	26
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	179	БА	73	Муж	154
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	267	БА	73	Муж	40
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	116 (1166)	БА	81	Муж	41
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	279 (9)	БА	83	Муж	59
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	312	БА	87	Муж	49
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	323	БА	89	Жен	50
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	168 (5)	Норма	57	Муж	83
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	136	Норма	64	Жен	22
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	202	Норма	74	Муж	57

Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	779	Норма	76	Жен	50
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	1619	Норма	80	Жен	52
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	147 (3)	Норма	>89	Жен	85
Мозг Лобная доля	Oregon Bank	PHK	1766_F C (13)	БА	63	Жен	76
Мозг Лобная доля	Oregon Bank	PHK	2274_F C	БА	65	Муж	86
Мозг Лобная доля	Oregon Bank	PHK	2318_F C	БА	74	Жен	20
Мозг Лобная доля	Oregon Bank	PHK	2486_F C (25)	БА	81	Муж	43
Мозг Лобная доля	Oregon Bank	PHK	1922_F C	БА	82	Муж	29
Мозг Лобная доля	Oregon Bank	PHK	2305_F C	БА	85	Жен	38
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	344_FC	БА	89	Жен	170
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	246_FC	БА	>89	Жен	115
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	145_FC	Норма	57	Жен	59
Мозг Лобная доля	Oregon Bank	PHK	2501_F C	Норма	63	Жен	11
Мозг Лобная доля	Oregon Bank	PHK	2779_F C	Норма	63	Муж	95
Мозг Лобная доля	Oregon Bank	PHK	2902_F C (30)	Норма	76	Жен	224
Мозг Лобная доля	New York Bank	PHK	638_FC	Норма	78	Муж	25
Мозг Лобная доля	Oregon Bank	PHK	1902_F C	Норма	81	Жен	27
Мозг Лобная доля	Oregon Bank	PHK	2545_F C (32)	Норма	83	Муж	55
Мозг Височная доля	Duke University Bank	ДНК	616br	БА	62	Жен	201
Мозг Височная доля	Duke University Bank	ДНК	438br	БА	65	Жен	200
Мозг Височная доля	Duke University Bank	ДНК	1200br	БА	69	Муж	116
Мозг Височная доля	Duke University Bank	ДНК	969br	БА	82	Жен	125
Мозг Височная доля	Duke University Bank	ДНК	1513br	БА	86	Муж	24
Мозг Височная доля	Duke University Bank	ДНК	623br	БА	89	Жен	166
Мозг Височная доля	Duke University Bank	ДНК	165br	Норма	66	Муж	139
Мозг Височная доля	Duke University Bank	ДНК	591br	Норма	78	Жен	123

Мозг Височная_дол я	Duke University Bank	ДНК	99br	Норма	85	Муж	81
Мозг Височная_дол я	Duke University Bank	ДНК	838br	Норма	>90	Муж	78
Мозг Височная_дол я	Duke University Bank	ДНК	909br	Норма	>90	Жен	115
Мозг Височная_дол я	New York Bank	РНК	203	БА	75	Жен	61
Мозг Височная_дол я	New York Bank	РНК	239	БА	86	Муж	70
Мозг Височная_дол я	New York Bank	РНК	246 (264)	БА	>89	Жен	91
Мозг Височная_дол я	New York Bank	РНК	188	БА	>90	Жен	111
Мозг Височная_дол я	New York Bank	РНК	168 (6)	Норма	57	Муж	123
Мозг Височная_дол я	New York Bank	РНК	343	Норма	62	Муж	37
Мозг Височная_дол я	New York Bank	РНК	346	Норма	84	Муж	44
Мозг Височная_дол я	New York Bank	РНК	230	Норма	87	Муж	48
Мозг Височная_дол я	New York Bank	РНК	325	Норма	>89	Муж	70
Мозг Височная_дол я	New York Bank	РНК	147	Норма	>89	Жен	49
Мозг Височная_дол я	Oregon Bank	РНК	1766_Т С (14)	БА	63	Жен	102
Мозг Височная_дол я	Oregon Bank	РНК	2274_Т С	БА	65	Муж	119
Мозг Височная_дол я	Oregon Bank	РНК	2318_Т С	БА	74	Жен	16
Мозг Височная_дол я	Oregon Bank	РНК	2486_Т С (26)	БА	81	Муж	54
Мозг Височная_дол я	Oregon Bank	РНК	1922_Т С	БА	82	Муж	24
Мозг Височная_дол я	Oregon Bank	РНК	2305_Т С	БА	85	Жен	50
Мозг Височная_дол я	New York Bank	РНК	246_TC	БА	>89	Жен	125

Мозг Височная_дол я	New York Bank	PHK	145_TC	Норма	57	Жен	39
Мозг Височная_дол я	Oregon Bank	PHK	2779_T C	Норма	63	Муж	91
Мозг Височная_дол я	Oregon Bank	PHK	2902_T C (31)	Норма	76	Жен	184
Мозг Височная_дол я	New York Bank	PHK	638_TC	Норма	78	Муж	28
Мозг Височная_дол я	Oregon Bank	PHK	1902_T C	Норма	81	Жен	31

Приложение 2

Таблица 8 Клонотипы со свойствами, характерными для пациентов с болезнью Альцгеймера

Ткань	CDR3aa	TRGV	TRGJ	Длина cdr3 (aa)	Индекс Гидропатии	Молекулярный Объем	Сила Взаимодействия
МОЗГ	CAAWDYKKKLF	TRGV10	TRGJ1	11	-0,19091	116,818	0,54545
МОЗГ	CAAWDYKKLF	TRGV10	TRGJ1	10	-0,08	114,4	0,5
МОЗГ	CATWDRLYYKKLF	TRGV7	TRGJ1	13	-0,40769	121,769	0,53846
МОЗГ	CATWDGPLYKKLF	TRGV2	TRGJ1	14	-0,2	112,357	0,5
МОЗГ	CATWDSYKKLF	TRGV5	TRGJ2	11	-0,37273	113	0,45455
МОЗГ	CATWDSYKKLF	TRGV8	TRGJ1	12	-0,45	115,333	0,5
МОЗГ	CATWDYKKLF	TRGV8	TRGJ2	10	-0,33	117	0,5
МОЗГ	CALWEVPTNYYKKLF	TRGV9	TRGJ1	15	-0,11333	116,267	0,53333
МОЗГ	CALWEVQRNYKKLF	TRGV9	TRGJ1	14	-0,43571	120,143	0,5
МОЗГ	CATWDAPNYYKKLF	TRGV2	TRGJ1	14	-0,56429	111,714	0,42857
МОЗГ	CATWDGLYYKKLF	TRGV2	TRGJ1	13	-0,09231	114,077	0,53846
МОЗГ	CATWDGPYYYKKLF	TRGV2	TRGJ2	14	-0,56429	113,571	0,5
МОЗГ	CATWDGRYKKLF	TRGV2	TRGJ1	12	-0,68333	113,833	0,41667
МОЗГ	CATWDRPNYYKKLF	TRGV7	TRGJ1	14	-1,01429	117,5	0,42857
МОЗГ	CATWDRYYKKLF	TRGV5	TRGJ2	12	-0,75833	121,583	0,5
МОЗГ	CATWVQRKKLF	TRGV8	TRGJ1	11	-0,20909	118,636	0,45455
МОЗГ	CALWEGYYYKKLF	TRGV9	TRGJ1	13	-0,13846	119,154	0,61538
МОЗГ	CALWEVHRYKKLF	TRGV9	TRGJ1	13	-0,17692	122,308	0,53846
МОЗГ	CATWDDYKKLF	TRGV5	TRGJ2	11	-0,61818	114,636	0,45455
МОЗГ	CATWDGEEYYKKLF	TRGV4	TRGJ1	14	-0,85714	112,643	0,42857
МОЗГ	CATWDKLF	TRGV4	TRGJ2	9	-0,22222	114,333	0,44444
МОЗГ	CATWDRRGYKKLF	TRGV3	TRGJ1	13	-0,97692	116,462	0,38462
МОЗГ	CAAWDYKRARSYKLF	TRGV10	TRGJ1	17	-0,9	117,471	0,41176
МОЗГ	CAAWERNYYKKLF	TRGV10	TRGJ1	13	-0,77692	119	0,46154
МОЗГ	CALWEANYYKKLF	TRGV9	TRGJ2	13	-0,13846	117,154	0,53846
МОЗГ	CALWEVNPHYYKKLF	TRGV9	TRGJ1	15	-0,28	117,933	0,53333
МОЗГ	CATWAPNYYKKLF	TRGV4	TRGJ1	13	-0,33846	113,308	0,46154
МОЗГ	CATWDAYKKLF	TRGV4	TRGJ1	11	-0,13636	112,455	0,45455
МОЗГ	CATWDGNYYKKLF	TRGV2	TRGJ2	13	-0,65385	111,923	0,46154
МОЗГ	CATWDGYKKLF	TRGV2	TRGJ2	12	-0,41667	113,25	0,5
МОЗГ	CATWDLYYKKLF	TRGV4	TRGJ1	12	-0,06667	119,583	0,58333
МОЗГ	CATWDNVYYKKLF	TRGV2	TRGJ1	13	-0,3	116,308	0,53846
МОЗГ	CATWDREKLF	TRGV3	TRGJ1	10	-0,61	115,1	0,4
МОЗГ	CATWDRGYKKLF	TRGV5	TRGJ2	12	-0,68333	113,833	0,41667
МОЗГ	CATWDRGYKKLF	TRGV2	TRGJ2	13	-0,73077	115,923	0,46154

MO3Г	CATWDRHYKKLF	TRGV3	TRGJ1	12	-0,91667	119,667	0,41667
MO3Г	CATWDRHYKKLF	TRGV3	TRGJ2	13	-0,94615	121,308	0,46154
MO3Г	CATWDRNYYKKLF	TRGV3	TRGJ1	13	-0,96923	119,615	0,46154
MO3Г	CATWDTNYYKKLF	TRGV2	TRGJ1	13	-0,67692	115,385	0,46154
MO3Г	CATWDVNYKKLF	TRGV2	TRGJ1	12	-0,21667	114,25	0,5
MO3Г	CATWDWDNKKLF	TRGV4	TRGJ1	12	-0,825	114,917	0,41667
MO3Г	CATWERRPENYYK KLF	TRGV4	TRGJ1	16	-1,3875	120	0,375
MO3Г	CATWGNYYKKLF	TRGV3	TRGJ1	12	-0,41667	113,667	0,5
MO3Г	CAAWDAHYYKKLF	TRGV10	TRGJ1	13	-0,26923	113,077	0,46154
MO3Г	CAAWDLDYKKLF	TRGV10	TRGJ2	13	-0,13846	115,385	0,53846
MO3Г	CAAWDPYKKLF	TRGV10	TRGJ1	11	-0,21818	112,182	0,45455
MO3Г	CAAWDRPNYYKKL F	TRGV10	TRGJ1	14	-0,83571	115,643	0,42857
MO3Г	CAAWDYHYKKLF	TRGV10	TRGJ1	12	-0,44167	116,917	0,5
MO3Г	CAAWDYKGYKKLF	TRGV10	TRGJ1	13	-0,49231	112,923	0,46154
MO3Г	CAAWDYTNYYKKL F	TRGV10	TRGJ1	14	-0,54286	115,357	0,5
MO3Г	CAFLRPAPNYYKKL F	TRGV9	TRGJ1	15	-0,15333	114,267	0,46667
MO3Г	CALWEDYYKKLF	TRGV9	TRGJ1	12	-0,3	120,917	0,58333
MO3Г	CALWEGHYKKLF	TRGV9	TRGJ1	12	-0,2	115,417	0,5
MO3Г	CALWEGRGYKKLF	TRGV9	TRGJ1	13	-0,31538	112,538	0,46154
MO3Г	CALWEGSYKKLF	TRGV9	TRGJ1	13	-0,1	113,923	0,53846
MO3Г	CALWEKPSENYK KLF	TRGV9	TRGJ1	16	-0,8375	116,438	0,4375
MO3Г	CATWANYKKLF	TRGV4	TRGJ2	11	-0,13636	112,909	0,45455
MO3Г	CATWDDYYKKLF	TRGV2	TRGJ2	12	-0,675	116,833	0,5
MO3Г	CATWDGHNYKKL F	TRGV2	TRGJ1	14	-0,83571	112,357	0,42857
MO3Г	CATWDGHYYKKLF	TRGV5	TRGJ2	13	-0,63077	113,615	0,46154
MO3Г	CATWDGLEYYKKLF	TRGV4	TRGJ1	13	-0,26154	111,615	0,46154
MO3Г	CATWDGLRGYNYK KKLF	TRGV2	TRGJ1	17	-0,64118	112,706	0,47059
MO3Г	CATWDGLRYKKLF	TRGV2	TRGJ1	13	-0,33846	114,615	0,46154
MO3Г	CATWDGQNYKKL F	TRGV2	TRGJ1	14	-0,85714	112,071	0,42857
MO3Г	CATWDGRVKYKKL F	TRGV4	TRGJ1	14	-0,56429	114,714	0,42857
MO3Г	CATWDGRYYKKLF	TRGV2	TRGJ2	13	-0,73077	115,923	0,46154
MO3Г	CATWDKRFGYKKL F	TRGV3	TRGJ1	14	-0,66429	116,857	0,42857
MO3Г	CATWDPNYYKKLF	TRGV8	TRGJ2	13	-0,74615	115,154	0,46154
MO3Г	CATWDPTMDNYK KLF	TRGV8	TRGJ1	16	-0,75	112,813	0,4375
MO3Г	CATWDRCYKKLF	TRGV3	TRGJ1	13	-0,50769	118,846	0,53846
MO3Г	CATWDRDYKKLF	TRGV5	TRGJ1	13	-0,96923	119,231	0,46154
MO3Г	CATWDRKLF	TRGV8	TRGJ1	9	-0,28889	115,778	0,44444
MO3Г	CATWDRLGDYKKL F	TRGV3	TRGJ1	14	-0,56429	112,929	0,42857
MO3Г	CATWDRPAYYKKL F	TRGV8	TRGJ1	14	-0,63571	115,429	0,42857

МОЗГ	CATWDRPGYYYYK LF	TRGV7	TRGJ1	15	-0,82667	115,867	0,46667
МОЗГ	CATWDRPKDYKKL F	TRGV3	TRGJ1	14	-1,2	116,714	0,35714
МОЗГ	CATWDRRDYYKKL F	TRGV3	TRGJ2	14	-1,22143	121,286	0,42857
МОЗГ	CATWDRRGKVKKL F	TRGV3	TRGJ1	14	-0,79286	115,214	0,35714
МОЗГ	CATWDRVQEYKKL F	TRGV8	TRGJ1	14	-0,75714	117,571	0,42857
МОЗГ	CATWEKKLF	TRGV5	TRGJ1	9	-0,22222	116,333	0,44444
МОЗГ	CATWGYYKKLF	TRGV3	TRGJ1	11	-0,13636	115,273	0,54545
МОЗГ	CATWNYYKKLF	TRGV3	TRGJ1	11	-0,41818	119,636	0,54545
МОЗГ	SYKKLF	TRGV4	TRGJ1	7	-0,65714	126,286	0,57143
МОЗГ	CAAKKDIKKLF	TRGV8	TRGJ1	11	-0,17273	112,182	0,36364
МОЗГ	CAARNYYKKLF	TRGV10	TRGJ1	11	-0,51818	115,909	0,45455
МОЗГ	CAAWDFPNYYKKL F	TRGV10	TRGJ2	14	-0,31429	114,714	0,5
МОЗГ	CAAWDHPPILRDYY KKLF	TRGV10	TRGJ1	18	-0,45556	115	0,44444
МОЗГ	CAAWDLNYYKKLF	TRGV10	TRGJ1	13	-0,13846	115,769	0,53846
МОЗГ	CAAWDQRLYKKLF	TRGV10	TRGJ1	13	-0,38462	117,692	0,46154
МОЗГ	CAAWDRSLYYKKL F	TRGV10	TRGJ1	14	-0,25714	116,429	0,5
МОЗГ	CAAWDSNYYKKLF	TRGV10	TRGJ1	13	-0,49231	111,846	0,46154
МОЗГ	CAAWDSWGNYY KKIL	TRGV10	TRGJ1	16	-0,43125	113,563	0,5
МОЗГ	CAAWDSWGNYY KKLF	TRGV10	TRGJ2	16	-0,5375	114,25	0,5
МОЗГ	CAAWDYNHKKLF	TRGV10	TRGJ1	12	-0,625	113,167	0,41667
МОЗГ	CAAWDYNYYKKLF	TRGV10	TRGJ1	12	-0,46667	115,083	0,5
МОЗГ	CAAWDYPYYKKLF	TRGV10	TRGJ1	13	-0,38462	116,615	0,53846
МОЗГ	CAAWDYRHYKKLF	TRGV10	TRGJ1	13	-0,75385	119,308	0,46154
МОЗГ	CAAWDYRYKKLF	TRGV10	TRGJ1	12	-0,55	119,417	0,5
МОЗГ	CAAWDYWANYYK KLF	TRGV10	TRGJ1	15	-0,4	116,8	0,53333
МОЗГ	CAAWGRNYYKKLF	TRGV10	TRGJ1	13	-0,53846	114,308	0,46154
кровь	CATWDGKKLF	TRGV2	TRGJ1	10	-0,24	107,7	0,4
кровь	CATWDRPYKKLF	TRGV3	TRGJ1	12	-0,78333	117,333	0,41667
кровь	CATWDGPYKKLF	TRGV2	TRGJ1	12	-0,44167	109	0,41667
кровь	CATWDGYKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,33636	110,727	0,45455
кровь	CATWDRRYKKLF	TRGV3	TRGJ1	12	-1,025	122,167	0,41667
кровь	CATWDGRGKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,30909	103,455	0,36364
кровь	CATWDGHYKKLF	TRGV2	TRGJ1	12	-0,575	111,333	0,41667
кровь	CATWDGPEKLF	TRGV3	TRGJ1	11	-0,32727	103,727	0,36364
кровь	CATWDGPKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,36364	106,091	0,36364
кровь	CATWDGRKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,62727	111,364	0,36364
кровь	CATWDRPKKLF	TRGV3	TRGJ1	11	-0,73636	115,182	0,36364
кровь	CAAWDKKLF	TRGV10	TRGJ1	9	0,05556	111,444	0,44444
кровь	CATWDGHKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,50909	108,636	0,36364
кровь	CATWDNYYKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,61818	115,091	0,45455
кровь	CATWDRRKLF	TRGV3	TRGJ1	11	-1	120,455	0,36364

кровь	CATWDSKKLF	TRGV3	TRGJ1	10	-0,28	110,2	0,4
кровь	CATWDGDKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,53636	106,182	0,36364
кровь	CATWDGDYKKLF	TRGV2	TRGJ1	12	-0,6	109,083	0,41667
кровь	CATWDRKKLF	TRGV3	TRGJ1	10	-0,65	117,7	0,4
кровь	CATWDRPGKLF	TRGV7	TRGJ1	11	-0,41818	107,273	0,36364
кровь	CATWDRYKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,70909	119,818	0,45455
кровь	CATWDGGYKKLF	TRGV2	TRGJ1	12	-0,34167	105,5	0,41667
кровь	CATWDGPGKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,04545	98,1818	0,36364
кровь	CATWDRDYKKLF	TRGV7	TRGJ1	12	-0,94167	117,417	0,41667
кровь	CATPNYYKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,48182	113	0,45455
кровь	CATWDGNYKKLF	TRGV2	TRGJ1	12	-0,6	109,5	0,41667
кровь	CATWDGQYKKLF	TRGV2	TRGJ1	12	-0,6	111	0,41667
кровь	CATWDGSYKKLF	TRGV2	TRGJ1	12	-0,375	107,583	0,41667
кровь	CATWDRPEKLF	TRGV3	TRGJ1	11	-0,7	112,818	0,36364
кровь	CAAWDSYKKLF	TRGV10	TRGJ1	11	-0,14545	110,636	0,45455
кровь	CATWDGGKLF	TRGV2	TRGJ1	10	0,11	99	0,4
кровь	CATWDGKLF	TRGV2	TRGJ1	9	0,16667	104,667	0,44444
кровь	CATWDPKKLF	TRGV2	TRGJ1	10	-0,36	111,9	0,4
кровь	CATWDRRGKLF	TRGV3	TRGJ1	11	-0,68182	112,545	0,36364
кровь	CATWEGYKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,33636	112,364	0,45455
кровь	CATSNYKKLF	TRGV4	TRGJ1	11	-0,40909	111,455	0,45455
кровь	CATWDEKLF	TRGV2	TRGJ1	9	-0,17778	111,444	0,44444
кровь	CATWDGNKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,53636	106,636	0,36364
кровь	CATWDGPGKKLF	TRGV2	TRGJ1	12	-0,36667	101,25	0,33333
кровь	CATWDGREKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,59091	109	0,36364
кровь	CATWDRLGKLF	TRGV7	TRGJ1	11	0,07273	110,364	0,45455
кровь	CATWDDKKLF	TRGV2	TRGJ1	10	-0,55	112	0,4
кровь	CATWDGGKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,25455	102,273	0,36364
кровь	CATWDGLKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	0,12727	109,182	0,45455
кровь	CATWDGPKKLF	TRGV2	TRGJ1	12	-0,625	104,833	0,33333
кровь	CATWDRGKLF	TRGV3	TRGJ1	10	-0,3	109	0,4
кровь	CATWDRNYKKLF	TRGV3	TRGJ1	12	-0,94167	117,833	0,41667
кровь	CATWDGLGKLF	TRGV2	TRGJ1	11	0,44545	101,273	0,45455
кровь	CATWDGLRKLF	TRGV2	TRGJ1	11	0,07273	110,364	0,45455
кровь	CATWDRDKKLF	TRGV3	TRGJ1	11	-0,90909	115,273	0,36364
кровь	CATWDRLKLF	TRGV3	TRGJ1	11	-0,24545	118,273	0,45455
кровь	CATWGKKLF	TRGV3	TRGJ1	9	0,12222	109,556	0,44444
кровь	CATWDGEKLF	TRGV2	TRGJ1	10	-0,2	105,1	0,4
кровь	CATWDGLEKLF	TRGV2	TRGJ1	11	0,16364	106,818	0,45455
кровь	CATWDHYKKLF	TRGV3	TRGJ1	11	-0,59091	117,091	0,45455
кровь	CATWDRHKKLF	TRGV1	TRGJ1	11	-0,88182	117,727	0,36364
кровь	CATWDRPGKKLF	TRGV3	TRGJ1	12	-0,70833	109,583	0,33333
кровь	CATWEDYKKLF	TRGV3	TRGJ1	11	-0,61818	116,273	0,45455
кровь	CATWDGDWIKTF	TRGV2	TRGJP 2	12	-0,24167	107,417	0,41667
кровь	CATWDGRRKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,68182	112,545	0,36364
кровь	CATWDRNKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,90909	115,727	0,36364
кровь	CATWDRREKLF	TRGV7	TRGJ1	11	-0,96364	118,091	0,36364

кровь	CATWAKKLF	TRGV4	TRGJ1	9	0,36667	111,667	0,44444
кровь	CATWDGPRKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,41818	107,273	0,36364
кровь	CATWDGRGKKLF	TRGV2	TRGJ1	12	-0,60833	106,083	0,33333
кровь	CATWDGRKLF	TRGV2	TRGJ1	10	-0,3	109	0,4
кровь	CATWDKDYKKLF	TRGV3	TRGJ1	12	-0,89167	116,333	0,41667
кровь	CATWDRSYKKLF	TRGV3	TRGJ1	12	-0,71667	115,917	0,41667
кровь	CATWDTYKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,36364	114,818	0,45455
кровь	CATWDAKKLF	TRGV2	TRGJ1	10	-0,02	109,6	0,4
кровь	CATWDGQGKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,21818	100,364	0,36364
кровь	CATWDGSKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,29091	104,545	0,36364
кровь	CATWDHKKLF	TRGV2	TRGJ1	10	-0,52	114,7	0,4
кровь	CATWDNKKLF	TRGV3	TRGJ1	10	-0,55	112,5	0,4
кровь	CATWDPYKKLF	TRGV4	TRGJ1	11	-0,44545	114,545	0,45455
кровь	CATWDRGKKLF	TRGV3	TRGJ1	11	-0,62727	111,364	0,36364
кровь	CATWGGYKKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,05455	106,818	0,45455
кровь	CATWGNKKLF	TRGV4	TRGJ1	10	-0,24	108,2	0,4
кровь	CATWDRLEKLF	TRGV3	TRGJ1	11	-0,20909	115,909	0,45455
кровь	CATWDRRKLF	TRGV5	TRGJ1	10	-0,71	119	0,4
кровь	CATWDSYKKLF	TRGV3	TRGJ1	12	-0,63333	111,167	0,41667
кровь	CATWDSGYKKLF	TRGV3	TRGJ1	12	-0,375	107,583	0,41667
кровь	CATWGSDWIKTF	TRGV4	TRGJP 2	12	-0,01667	105,917	0,41667
кровь	CATKKLF	TRGV10	TRGJ1	7	0,34286	110,714	0,42857
кровь	CATQNYYKKLF	TRGV4	TRGJ1	11	-0,65455	115,182	0,45455
кровь	CATWDGLGKKLF	TRGV2	TRGJ1	12	0,08333	104,083	0,41667
кровь	CATWDGPRKKLF	TRGV2	TRGJ1	12	-0,70833	109,583	0,33333
кровь	CATWDGRLF	TRGV2	TRGJ1	9	0,1	106,111	0,44444
кровь	CATWDGRQKLF	TRGV2	TRGJ1	11	-0,59091	109,455	0,36364
кровь	CATWDRPKKLF	TRGV3	TRGJ1	12	-0,96667	113,167	0,33333