

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Алисейчик Мария Павловна

**Иммуногенетические факторы болезни Альцгеймера:
анализ Т-клеточного репертуара**

03.03.03 – Иммунология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в лаборатории эволюционной геномики Института общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Научный руководитель – *Розаев Евгений Иванович –
доктор биологических наук, профессор*

Официальные оппоненты – *Сапожников Александр Михайлович –
доктор биологических наук, профессор,
руководитель лаборатории клеточных
взаимодействий Института биоорганической
химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН*

*Захарова Мария Николаевна –
доктор медицинских наук, профессор,
главный научный сотрудник, руководитель 6
неврологического отделения Федерального
государственного бюджетного научного
учреждения "Научный центр неврологии"*

*Ефимов Григорий Александрович –
кандидат биологических наук, заведующий
лабораторией трансплантационной
иммунологии Национального медицинского
исследовательского центра гематологии*

Защита диссертации состоится «28» сентября 2020 года в 15:40 на заседании диссертационного совета МГУ.03.12 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. ББА.

E-mail: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией, а также со сведениями о регистрации участия в удаленном интерактивном режиме в защите можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/303748888/>

Автореферат разослан августа 2020 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Д.Б. Киселевский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Schwartz and Baruch, 2014; Marsh *et al.*, 2016; Colonna and Brioschi, 2020). 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 (Lane, Hardy and Schott, 2018). 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) (Goate *et al.*, 1991; Rogaev *et al.*, 1995; Sherrington *et al.*, 1995). ε4 аллель гена аполипопротеина E является еще одним генетическим фактором риска развития БА, подтвержденным в популяционных исследованиях (Saunders *et al.*, 1993; Bertram *et al.*, 2007). 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 (Penninkilampi, Brothers and Eslick, 2016). 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 (Ransohoff, 2016; Biragyn, Aliseychik and Rogaev, 2017). 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 (Heppner, Ransohoff and Becher, 2015; Aliseychik, Andreeva and Rogaev, 2018). Согласно эпидемиологическим исследованиям, длительное применение нестероидных противовоспалительных препаратов снижает риск возникновения болезни Альцгеймера (McGeer, Rogers and McGeer, 2016). 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, различных

хемокины и цитокины (Bagyinszky *et al.*, 2017). Известно, что развитие инфекционных заболеваний у пациентов с болезнью Альцгеймера приводит к ускорению развития патологии и нарушению когнитивных функций (McManus and Heneka, 2017). 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 Т-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 Т-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 отсековены 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 Т-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

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.

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.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения, заключение, выводы, список литературы, состоящий из 152 источников, и два приложения. Работа представлена на 103 страницах, содержит 19 рисунков и 8 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Оптимизация метода получения репертуаров TRG человека

Репертуары CDR3 регионов TRG получали с помощью мультиплексной ПЦР с использованием олигонуклеотидов, разработанных консорциумом BIOMED2 для диагностики лимфопролиферативных заболеваний (van Dongen *et al.*, 2003). Дополнительно нами были разработаны олигонуклеотиды, комплементарные TRGJP сегменту и фрагменту гена домашнего хозяйства *ALB* для оценки качества ДНК. Из очищенных ПЦР-продуктов путем лигирования адаптеров получали библиотеки для глубокого секвенирования на платформе MiSeq (Illumina)

Оценка воспроизводимости получаемых результатов.

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 1Б-В). Значение индекса Мориситы-Хорна для обеих пар образцов составило 0,95.

При кластеризации по Жаккару парных репертуаров, полученных из лобных и височных участков коры головного мозга от одних и тех же индивидов, 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 1А).

Для подтверждения непосредственного присутствия Т-лимфоцитов в анализируемых тканях головного мозга человека была проведена иммунофлуоресцентная визуализация клеток методом конфокальной микроскопии. Для окраски были использованы конъюгированные с флуорохромами антитела к CD3 и гамма-дельта Т-клеточному рецептору. 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 (Рисунок 1Г).

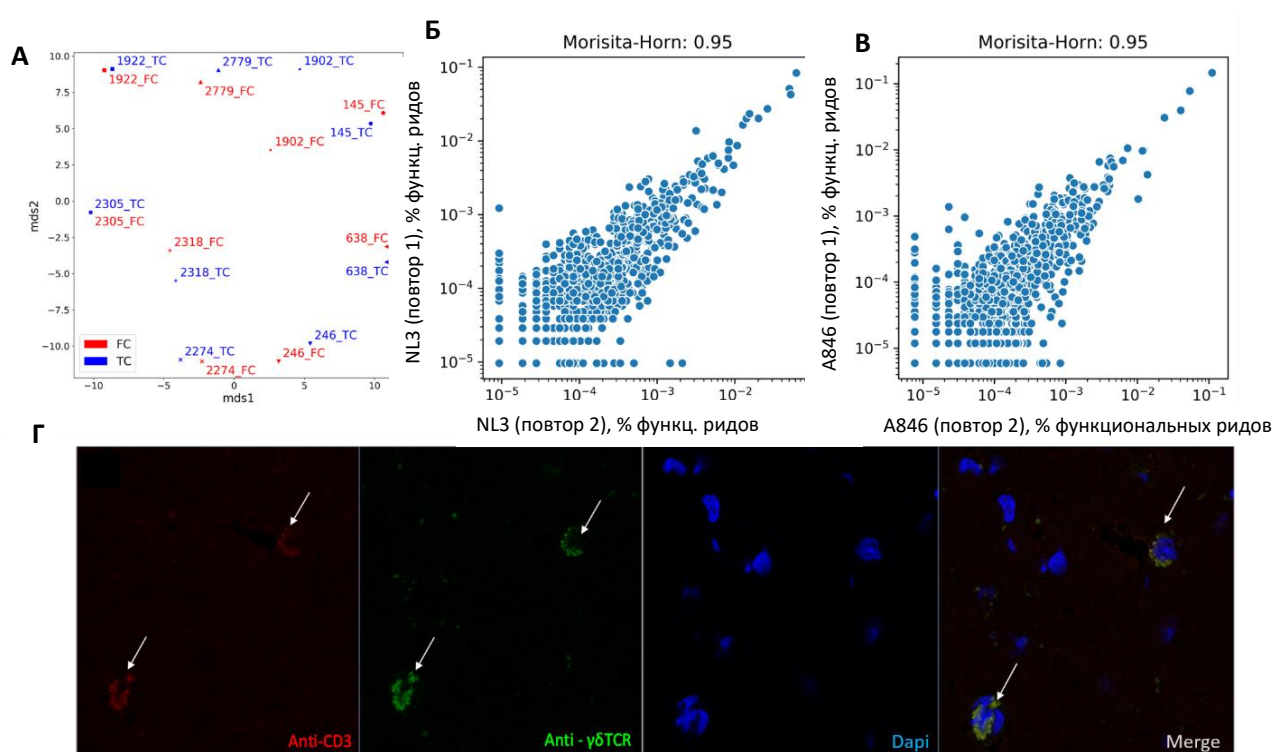


Рисунок 1 Верификация метода получения TRG репертуаров человека и результаты конфокальной микроскопии образцов головного мозга человека. Многомерное шкалирование с использованием коэффициентов Жаккара показало, что репертуары TRG из лобной и височной коры головного мозга одного и того же индивида кластеризуются вместе (А). Две независимые повторности репертуаров периферической крови доноров NL3 и A846 демонстрируют высокую степень воспроизводимости частот клонотипов (Б,В). Результаты конфокальной микроскопии подтвердили наличие $\gamma\delta$ Т-клеток, двойных положительных по CD3 и гамма цепи ТКР, в срезах головного мозга человека (Г).

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). 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. 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. 42,5% от всех клонотипов, обнаруженных в тканях головного мозга, также встречались хотя бы в одном репертуаре периферической крови. Для корректного сравнения свойств репертуаров TRG между группами 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.

Возрастные изменения репертуара TRG человека

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. 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 2А; $p = 4.4 \times 10^{-5}$). Этот эффект остается статистически значимым при анализе репертуаров крови только условно здоровых доноров ($p = 0.0007$; Рисунок 2Е). Регрессионный анализ числа клонотипов в

репертуарах периферической крови также выявил уменьшение числа клонотипов с возрастом ($p=7.004e-06$). При анализе репертуаров TRG из тканей головного мозга возрастные различия в группах доноров моложе 80 и от 80 лет и старше также заключаются в уменьшении числа уникальных клонотипов с возрастом, однако эффект выражен слабее и статистическая значимость есть для данных, полученных с использованием ДНК, но не РНК-репертуаров. Однако при объединении ДНК- и РНК-репертуаров статистическая значимость сохраняется ($p=0,026$; Рисунок 2Б). Далее клональность репертуаров была оценена с использованием энтропии Шеннона и Шеннона-Винера. Для репертуаров из периферической крови было показано значимое увеличение клональности с использованием обеих метрик ($p=0.0003$ энтропия Шеннона; $p=0.04$ энтропия Шеннона Винера, Рисунок 2В,Д).

Снижение энтропии Шеннона было статистически значимо при анализе только условно здоровых доноров (Рисунок 23).

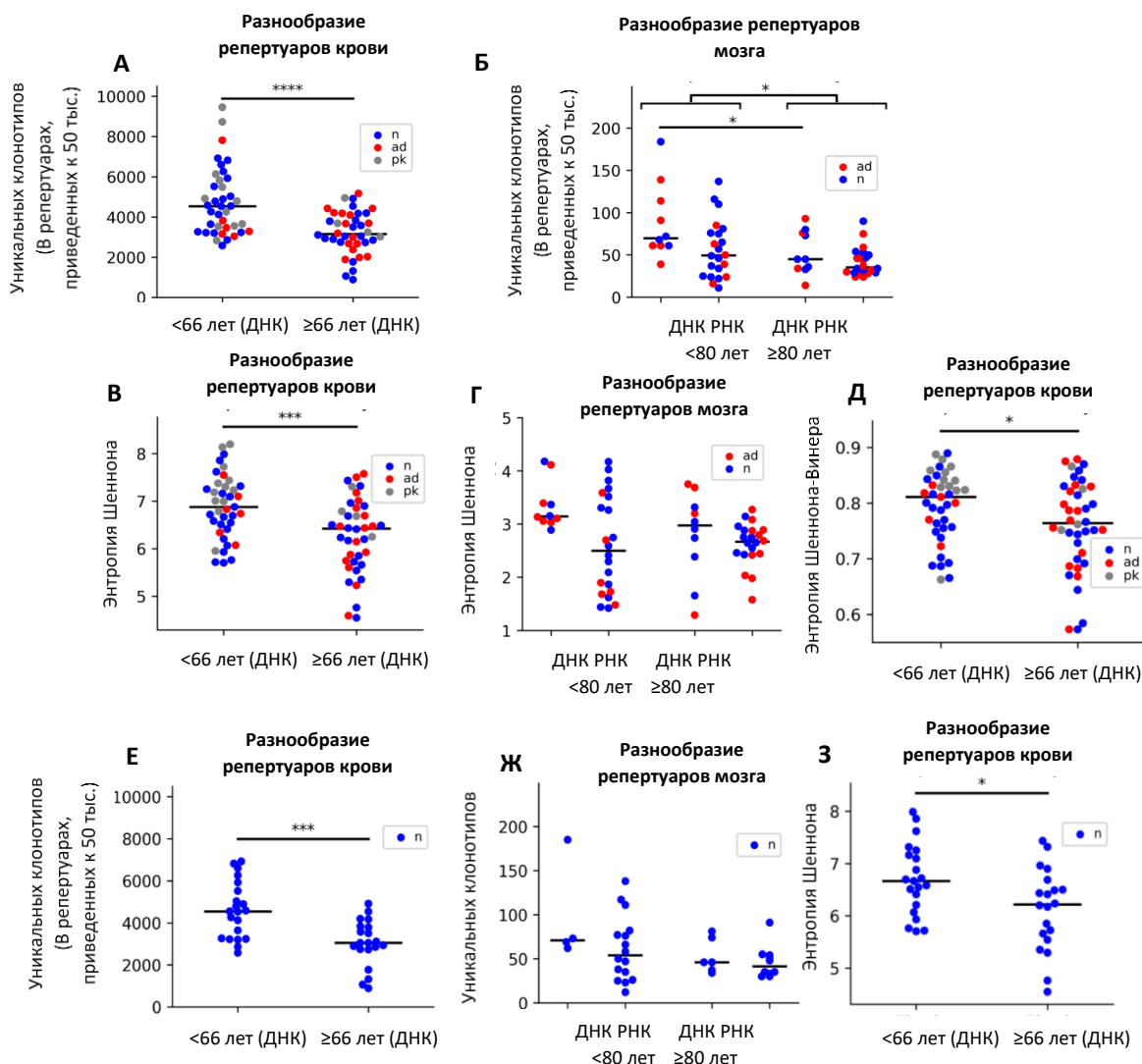


Рисунок 2 Изменения разнообразия и клоальности репертуаров CDR3 регионов TRG человека в процессе старения. Среднее число уникальных клонотипов после приведения репертуаров к 50000 прочтениям снижается с возрастом (А, Б). Индексы энтропии Шеннона (В) и нормализованной энтропии Шеннона-Винера (Д) ниже 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 **** $P < 0.0001$

На ДНК-репертуарах из тканей коры головного мозга были получены корреляции частот TRGV9 и TRGV2/4/8 с возрастом. Частота наиболее распространенного в крови TRGV9 сегмента постепенно снижается с возрастом в тканях головного мозга ($p=0.001$; Рисунок 3А), в то время как

частота клонотипов с использованием TRGV2/4/8 сегментов – растет ($p=0.005$; Рисунок 3Б).

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.

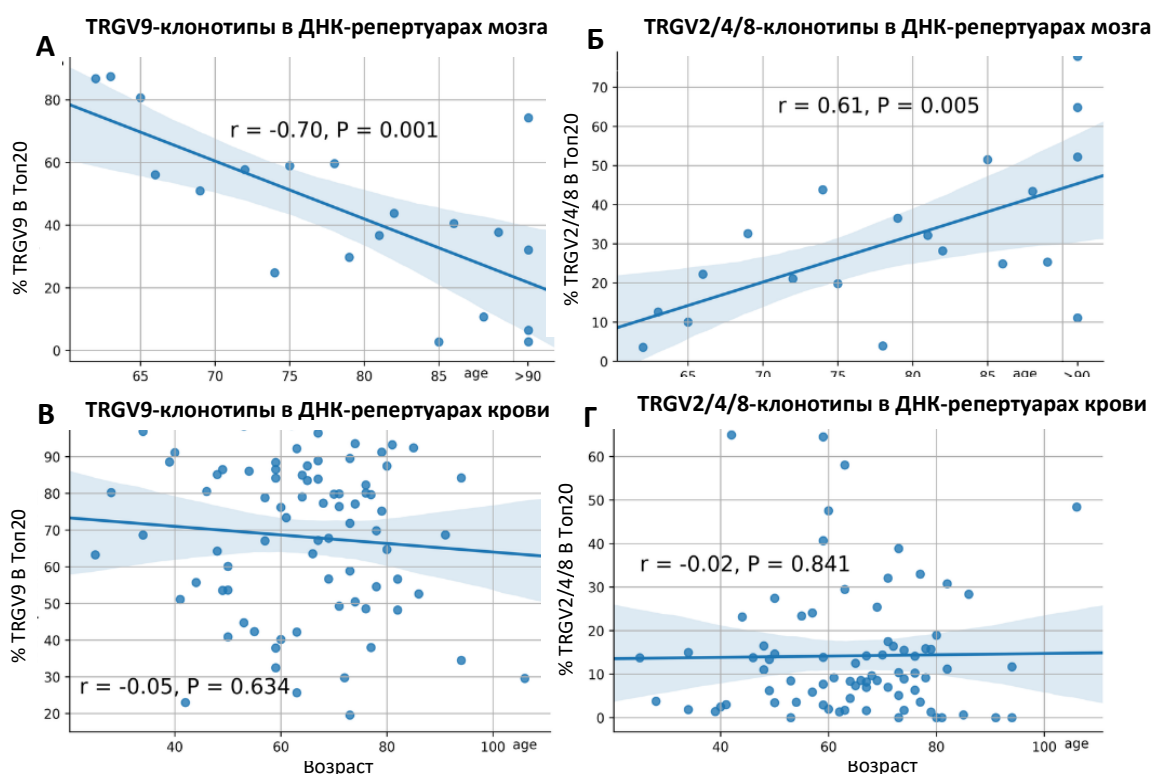


Рисунок 3 Регрессионный анализ частот TRGV9 и TRGV2/4/8 сегментов в Top 20 клонотипов в ДНК-репертуарах TRG из тканей головного мозга человека и периферической крови при старении. Частота клонотипов с использованием сегмента TRGV9 с возрастом в головном мозге снижается (А), в то время как клонотипы с TRGV2/4/8 становятся более широко представлены в репертуаре (Б), данная тенденция не характерна для репертуаров периферической крови (В,Г).

Сравнение репертуаров TRG головного мозга и периферической крови человека.

Так как репертуары из головного мозга и периферической крови сильно отличаются по числу обнаруженных клонотипов, все анализы проводились на Топ20 клонотипов с пересчетом соответствующих частот. Сегменты TRGV2, TRGV4, TRGV8 были объединены в одну группу, так как они являются близкородственными (Adams, Gu and Luoma, 2015). Для сравнения использовали критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным тестом Данна и поправкой на множественное тестирование Холма-Бонферрони.

Были проведены попарные сравнения частот всех сегментов. Наиболее выраженной является разница в частотах наиболее широко представленного TRGV9 сегмента: в репертуарах головного мозга она значительно ниже, чем в периферической крови (Рисунок 4А; $p=0.045$ для ДНК-репертуаров и $p=9.65e-08$ для РНК-репертуаров). После объединения TRGV2, TRGV4 и TRGV8 сегментов в одну группу (TRGV2/4/8), средняя частота этой группы оказалась значимо выше в репертуарах головного мозга в сравнении с периферической кровью (Рисунок 4Б; $p=0.028$ 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).

Для качественного сравнения репертуаров крови и головного мозга на уровне клонотипов были выбраны следующие две группы клонов: 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 (Lee *et al.*, 2019)). Было показано, что клоны CALW...LGKKIKVF преобладают в периферической крови, но не в тканях головного мозга (Рисунок 4В; $p=0.0096$ и $p=0.0004$ для ДНК и РНК репертуаров мозга, соответственно). При этом в частотах CALW...YYKKLF разницы обнаружено не было (Рисунок 4Г; $p=0.16$).

Далее были проанализированы физико-химические свойства репертуаров TRG в контексте сравнения репертуаров крови и головного мозга. Сравнивались средневзвешенные значения следующих характеристик: длина CDR3 (количество аминокислот), индекс гидропатии (по шкале Кайта-Дулиттла), объём ($\text{\AA}^3$), потенциальная сила взаимодействия. 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 4Е; $p=0.016$ и $p=7.757e-07$ для ДНК и РНК репертуаров, соответственно).

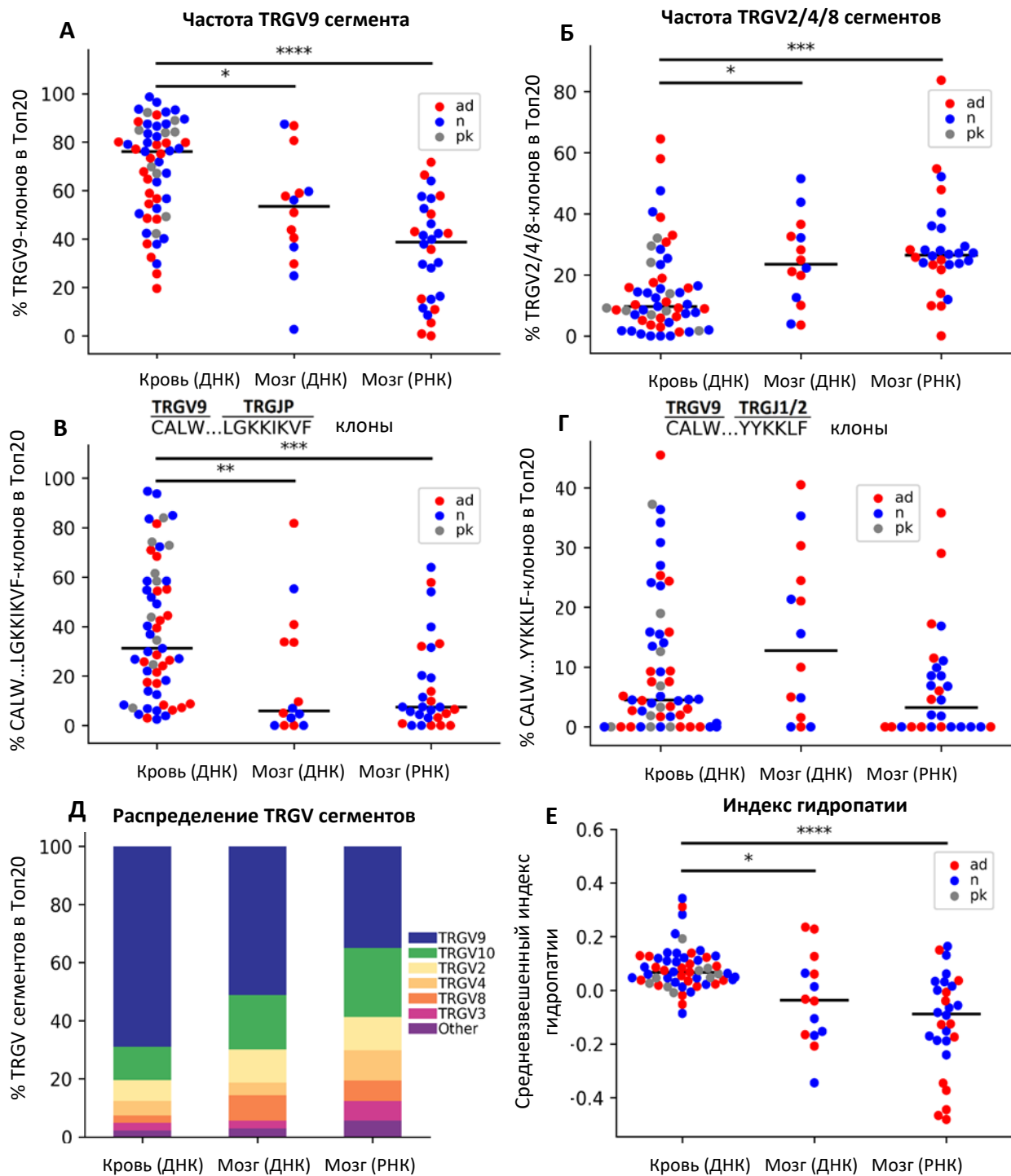


Рисунок 4 Сравнительный анализ ДНК и РНК-репертуаров TRG головного мозга и ДНК-репертуаров периферической крови человека. Сравнились частоты TRGV9 (А) и TRGV2/4/8 (Б) клонотипов, а также группы клонотипов CALW...LGKKIKVF (В) и CALW...YYKKLF (Г) в Топ-20. Общее распределение частот TRGV сегментов представлено на рисунке Д. Также было показано, что средневзвешенные индексы гидропатии (нормализованные на длину CDR3) репертуаров головного мозга ниже в сравнении с репертуарами периферической крови (Е). Красным обозначены данные для пациентов с БА, серым – пациентов с БП, синим – норма. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Особенности TRG репертуара индивидов с болезнью Альцгеймера

Для сравнения физико-химических свойств субрепертуаров использовались ANOVA и критерий Краскела-Уоллиса с апостериорным критерием Данна, частоты клонотипов с выбранными характеристиками сравнивались с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента. Первичный анализ частот TRGV сегментов и физико-химических свойств полных репертуаров не выявил выраженных особенностей репертуаров больных по сравнению со здоровыми. Статистически значимо оказалось только увеличение в показателях объема CDR3 регионов репертуаров из головного мозга пациентов с БА. Анализ частот публичных клонотипов не выявил разницы между больными и здоровыми.

Так как субпопуляция TRGV9-TRGJP клонов может 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%. 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. 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”). Были найдены 40 “Общих для БА” в репертуарах головного мозга и 1255 “Общих для БА” в периферической крови (Рисунок 5).



Рисунок 5 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, индекса 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 (Рисунок 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 (Kyte and Doolittle, 1982).

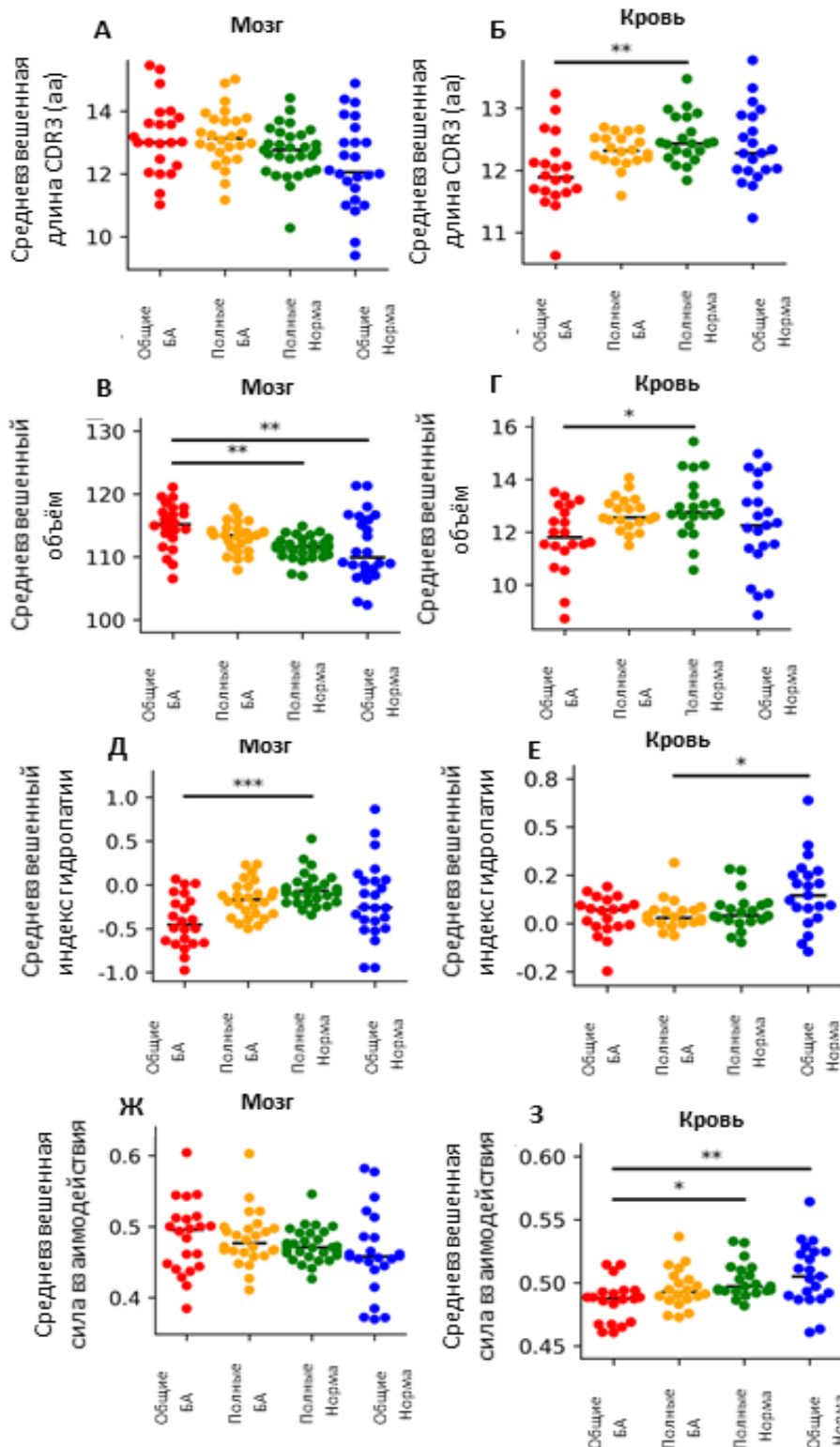


Рисунок 6 Сравнительный анализ физико-химических свойств субрепертуаров и полных репертуаров из головного мозга (А, В, Д, Ж) и периферической крови (Б, Г, Е, З). Сравнивались значения взвешенной средней длины CDR3 регионов (А, Б), взвешенного молекулярного объема, нормализованного на длину CDR3 региона (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. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Далее выбирали показатели, которые наилучшим образом характеризуют БА-ассоциированные клонотипы для последующего кластерного анализа. В среднем субрепертуары головного мозга включали 4,8 клонотипа, субрепертуары 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.

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 7А-Б).

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. 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 специфических 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 7.

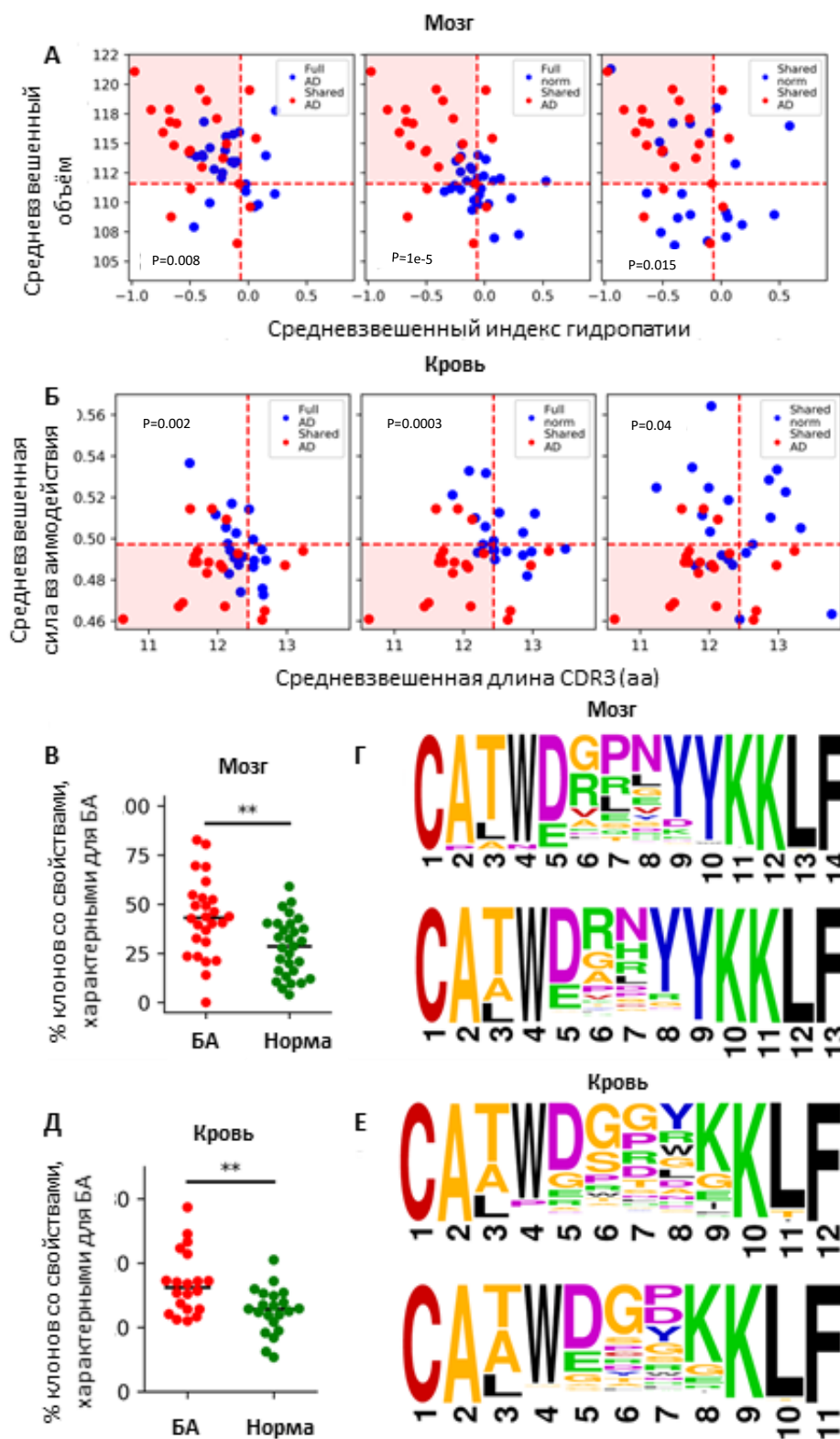
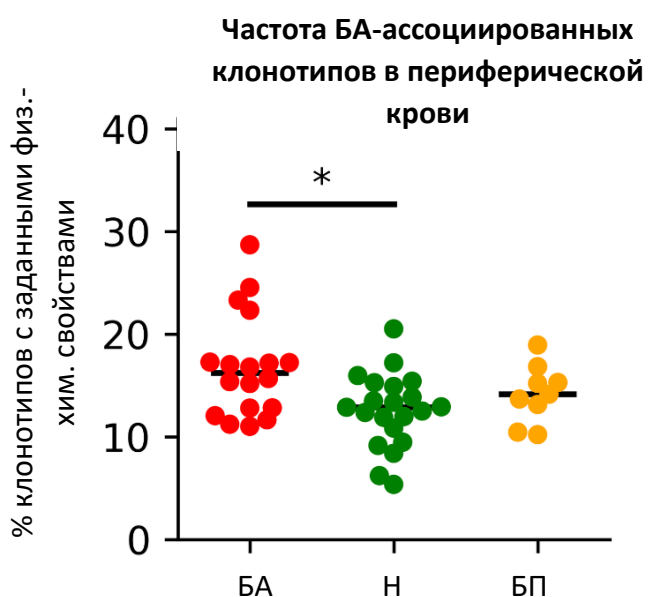


Рисунок 7 Результаты поиска клонотипов TRG, ассоциированных с болезнью Альцгеймера. Кластерный анализ TRG субрепертуаров “общих для БА” (красные точки) показал статистически значимую сегрегацию (слева направо) полных репертуаров БА и Нормы и субрепертуаров “общих для Нормы” (синие точки). В результате были выбраны пороговые значения (отмечены красной пунктирной линией) параметров, отличающих группу клонотипов общих для БА. (А-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, из периферической крови которых были приготовлены библиотеки TRG, чтобы выяснить, характерно ли увеличение описанной нами группы клонотипов исключительно для БА или и для других нейродегенеративных заболеваний. Были проанализированы репертуары от 18 пациентов с БА, 9 пациентов с БП и 21 пациента из контрольной группы. 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 (Рисунок 8).



*Рисунок 8 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. * $p < 0.05$.*

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 гидропатии.

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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ:

1. Biragyn A., **Aliseychik M.**, Rogaev E. 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.**, Андреева Т., Рогаев Е. Иммуногенетические факторы нейродегенеративных заболеваний: Роль HLA II класса. // БИОХИМИЯ, 2018. том 83, вып. 9, с. 1385 – 1398 Импакт-фактор (WoS) – 1.886
3. Gusev F., Reshetov D., Mitchell A., Andreeva T., Dincer A., Grigorenko A., Fedonin G., Halene T, **Aliseychik M.**, Filippova E., Weng Z., Akbarian S., Rogaev E. 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)