

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ГЕМАТОЛОГИИ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России)

125167, Москва, Новый Зыковский проезд,
дом 4
тел +7 (495) 612-21-23
факс +7 (495) 612-42-52
E-mail: director@blood.ru

«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор федерального
государственного
бюджетного учреждения «Национальный
медицинский исследовательский центр
гематологии» Министерства здравоохранения
Российской Федерации
Д.м.н., академик РАН
Савченко Валерий Григорьевич



Исх № _____ от _____

На № _____ от _____

18 сентября 2018 г.

О Т З Ы В В Е Д У Щ Е Й О Р Г А Н И З А Ц И И

На диссертационную работу **Погорелого Михаила Валерьевича**
**“Анализ вклада генетических факторов и факторов окружающей среды в
формирование репертуара Т-клеточных рецепторов монозиготных близнецов”**
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности – 03.01.03 – молекулярная биология

Система адаптивного иммунитета, существующая у всех челюстных, обладает принципиальной возможностью к распознаванию любого чужеродного антигена и, следовательно, патогена. Эта способность основана, в частности, на колоссальном разнообразии рецепторов Т-лимфоцитов. Их репертуар формируется в результате практически случайной реаранжировки зародышевых фрагментов

генов и последующего тимусного отбора функциональных но не аутореактивных клонов. Репертуар Т-лимфоцитарных рецепторов индивидуален для каждого человека, в то же время наблюдаются феномен так называемых «публичных клонов», присутствующих у многих индивидов. Кроме того последние исследования показывают, что клоны, специфичные к одному и тому же антигену, имеют высокий уровень гомологии. Это делает принципиально возможным предсказывать специфичность клона по его сходству с клонами с известной антигенной специфичностью. Уникальный репертуар каждого человека определяется индивидуальным набором аллелей генов, отвечающих за сборку зрелого рецептора, набором генов МНС и уникальной для каждого организма антигенной историей. Определенный вклад в строение индивидуальных репертуаров вносит, по всей видимости, и стохастический компонент.

Исследования репертуаров Т-лимфоцитарных клонов на монозиготных близнецах позволяет в значительной степени разграничить влияние генетических факторов (близнецы имеют идентичные гены, кодирующие компоненты механизма сборки Т-клеточных рецепторов и одинаковые наборы МНС и собственных пептидов, участвующих в тимусном отборе), факторов внешней среды (антигенная история для близнецов, выросших вместе будет похожа) и чисто стохастических процессов.

Вероятность для конкретного клона оказаться публичным зависит, с одной стороны, от вероятности сборки подобного клона, которая отрицательно коррелирует с его длиной и количеством случайных вставок, а также с вероятностью положительного отбора такого клона (специфичность к распространенному и иммунодоминантному антигену). Автор представленной диссертационной работы выдвигает гипотезу, что у монозиготных близнецов могут присутствовать общие клоны не имеющие очень высокой вероятности сборки и не специфичные к иммунодоминантным антигенам, чья публичность объясняется за счет внутриутробного обмена Т-лимфоцитами.

В своей работе Погорелый М. В. поставил целью проверку этой гипотезы и проведение анализа вклада генетических факторов и факторов окружающей среды

в формирование репертуара Т-клеточных рецепторов у пар монозиготных близнецов.

Для достижения этой цели автором были сформулированы отдельные задачи, которые делятся на технические, как разработка усовершенствованного метода создания библиотек для секвенирования репертуаров и алгоритмов биоинформатической обработки результатов секвенирования, и содержательные, которые включают в себя получение индивидуальных репертуаров рецепторов Т-лимфоцитов для трех пар монозиготных близнецов и сравнительный анализ индивидуальных репертуаров рецепторов Т-лимфоцитов с выявлением групп общих для обследуемых пар. Также автором были поставлены дополнительные задачи по исследованию общих клонотипов в парах монозиготных близнецов и между ними в ответ на вакцинацию вирусом желтой лихорадки и разработка системы биоинформатического выявления клонотипов, ассоциированных с определенными заболеваниями.

Все поставленные задачи были с успехом решены диссертантом. Был разработан метод получения библиотек репертуаров Т-лимфоцитарных рецепторов из РНК, выделяемой из периферических мононуклеаров или отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов. В ходе конструирования библиотек каждая молекула ДНК снабжается парой баркодов, один из которых дополнительно несет уникальный молекулярный идентификатор. Подобные библиотеки секвенируются методом высокопроизводительного параллельного секвенирования с парными прочтениями. При этом наличие баркодов позволяет исключить абсолютное большинство ошибок ПЦР и идентифицировать последовательности происходящие из одного клонотипа но полученные в результате отдельных событий обратной транскрипции (то есть с высокой долей вероятностей происходящих из разных клеток, принадлежащих к одному клону). Таким образом можно определить как общее разнообразие, так и клональность репертуара рецепторов. В ходе работы были также разработаны новые алгоритмы биоинформатической обработки результатов секвенирования.

Были получены репертуары альфа- и бета- цепей TCR шести здоровых молодых близнецовых доноров. На основании индивидуальных репертуаров была

вычислена модель сборки TCR для каждого донора, позволяющая рассчитать вероятность образования TCR с конкретной последовательностью. Было показано, что как для функциональных так и для нефункциональных репертуаров число идентичных клонотипов между репертуарами близнецов выше, чем у неродственных доноров. Затем была проанализирована структура последовательностей общих для близнецовых и неродственных пар и продемонстрировано, что эти последовательности существенно различаются. Если для неродственных пар пересекаются клоны, чья сборка наиболее вероятна (клоны с небольшим количеством случайных инсерций) то в близнецовых парах распределение вероятностей идентичных клонов имеет длинный хвост низковероятных последовательностей. Что доказывает высказанную автором гипотезу о внутриутробном обмене Т-лимфоцитами между близнецами. Дополнительно подтверждает эту гипотезу наблюдаемое автором неравномерное распределение общих нефункциональных клонотипов TCRbeta цепи по CD4+ CD8+ субпопуляциям лимфоцитов.

В работе также был проведен анализ числа инсерций в репертуаре клеток пуповинной крови и их зависимости от представленности конкретного клонотипа. Было показано, что среднее число вставок существенно ниже в группе самых крупных клонов. Такая же зависимость характерна для репертуаров наивных клеток взрослых доноров. При этом характеристическое время жизни клона с нулем вставок меньше, чем для наивных клеток в целом. Эти данные указывают на то, что наивные клоны без вставок, сформировавшиеся до рождения постепенно вытесняются наивными клетками, которые генерируются в тимусе в течение жизни.

Для выяснения того, насколько пересекаются клонотипы, проходящие экспансию в ответ на вирусную инфекцию у монозиготных близнецов были проанализированы репертуары четырех пар близнецовых доноров непосредственно перед и на 15 день после иммунизации вирусом желтой лихорадки. Несмотря на в целом уникальный иммунный ответ, между близнецами обнаруживается больше идентичных аминокислотных и нуклеотидных последовательностей TCR, чем между неродственными донорами. TCR распознающие эпитопы вируса жёлтой

лихорадки образуют несколько кластеров высокомологичных клонов, что по всей видимости определяется иммунным ответом на несколько иммунодоминантных эпитопов ВЖЛ.

Таким образом диссертантом была с успехом подтверждена выдвинутая гипотеза и получены новые интересные данные, в том числе впервые описаны динамические изменения проходящие параллельно в репертуарах Т-лимфоцитарных рецепторов монозиготных близнецов в ответ на введение живой вакцины против желтой лихорадки.

Диссертационная работа написана по классическому плану, изложена на 100 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка использованной литературы, включающего 96 ссылок. Работа содержит 28 рисунков и 12 таблиц.

Обзор литературы написан лаконично, очень четко и хорошим научным языком и охватывает такие аспекты, как формирование разнообразия репертуаров TCR и тимусная селекция, биоинформатическое моделирование процесса сборки Т-клеточного рецептора, особенности эмбрионального развития и адаптивного иммунитета близнецов, особенности раннего развития адаптивной иммунной системы, а также динамические аспекты иммунного ответа на вирус желтой лихорадки.

Раздел материалы и методы. В разделе «Материалы и методы» подробно изложены использованные в работе методы. В разделе «Результаты и обсуждение» четко и убедительно описаны полученные экспериментальные данные и дана их интерпретация. Отдельно следует отметить очень высокое качество рисунков и подписей к ним. Даже в отрыве от основного текста понятно, что изображено на том или ином рисунке и в подписи дана лаконичная интерпретация результатов.

К незначительным замечаниям можно отнести только пропущенные запятые в нескольких местах.

Подводя итог, хочется сказать, что представленная работа выполнена на очень высоком уровне и представляет собой удачно спланированное, выполненное и описанное исследование. Результаты, полученные в данной работе несомненно

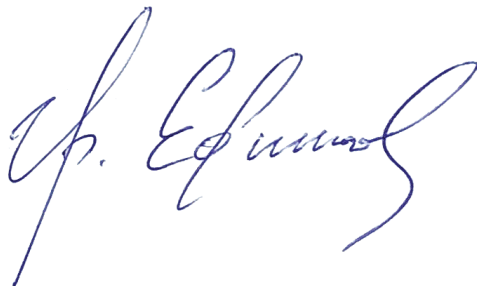
внесут вклад в понимание устройства адаптивной иммунной системы и в частности в формирование разнообразия репертуара и в развитие антиген-специфического иммунного ответа. Они без сомнения будут использованы другими исследователями.

Исходя из вышесказанного, можно сказать, что диссертационная работа Погорелого Михаила Валерьевича полностью соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 -Молекулярная биология.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории трансплантационной иммунологии (протокол № 1 от 29.08.2018 г.)

Составитель отзыва:

Ефимов Григорий Александрович, к.б.н.,
зав. лаб. трансплантационной иммунологии
ФГБУ «НМИЦ гематологии»
Москва, 125167, Новый Зыковский проезд, д. 4
+7 (495) 612-44-43
efimov.g@blood.ru



Подпись Ефимова Г.А. удостоверяю
Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ гематологии»
Джулакян У.Л.

