

## Отзыв

официального оппонента 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».

**Актуальность темы исследования.** Подобно ряду других областей современной молекулярной биологии, молекулярная иммунология обязана своему быстрому прогрессу в последние годы появившимся методам высокопроизводительного секвенирования. Эти методы позволяют получать огромные объемы данных, осмысление которых невозможно без использования мощных биоинформатических алгоритмов и точной формулировки тестируемых гипотез. Представленная к защите работа является примером удачного использования больших объемов данных для получения ответа на биологически важные вопросы о структуре и функционировании иммунной системы: роли пренатального обмена кровью между однояйцевыми близнецами в определении репертуара Т-клеточных рецепторов взрослых людей; времени жизни и скорости потери долгоживущих пренатальных клонотипов; структуры Т-клеточного иммунного ответа на одинаковый антигенный стимул у монозиготных близнецов; определения Т-клеточных маркеров при онкологических и аутоиммунных заболеваниях. Методы, разработанные в диссертации, и исследования, осуществленные с их использованием, безусловно, являются актуальными и соответствуют современному динамично развивающемуся направлению молекулярной биологии. Актуальность предложенных методов и востребованность полученных результатов не вызывает сомнений.

**Структура диссертации.** Диссертационная работа М.В. Погорелого с точки зрения оформления и подачи материала соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Представленная работа изложена на 100 страницах и включает в себя введение (где, в том числе, излагается актуальность, новизна и практическая значимость темы работы, цели и задачи исследования), обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений и список литературных источников из 96 наименований. Работа включает 28 рисунков и 12 таблиц, что предоставляет хороший иллюстративный материал и облегчает восприятие текста.

**Научная новизна и значимость результатов.** Близнецовый метод предоставляет возможность определять степень генетической обусловленности признака, что сделало его за прошедший век одним из основных инструментов количественной генетики. В представленной работе этот подход применён к иммунологии. Используя сравнение репертуаров Т-клеточных рецепторов однояйцевых близнецов и неродственных доноров, автор, в частности, показывает, что репертуары у однояйцевых близнецов более сходны, чем можно было бы ожидать на основании моделей сборки, построенных отдельно для каждого индивида, из чего делает вывод о наличии пренатального обмена Т-лимфоцитами. Разработанный подход к сопоставлению наблюдаемых и модельных репертуаров оказывается полезным также для решения других прикладных задач, выходящих за рамки заявленной темы диссертации. Для иллюстрации этого автор применяет его для уточнения списка маркерных перестроек при минимальной остаточной болезни и определения клонотипов, претерпевающих экспансию в ответ на цитомегаловирусную инфекцию. Однако ясно, что этот подход применим также для широкого спектра других задач. В целом диссертация иллюстрирует важность точного моделирования «нулевой модели», в данном случае – «нейтрального» Т-клеточного репертуара, который возникал бы в отсутствие изменения относительных частот клонов в ответ на антиген. Автор показывает, в частности, что использование неточной нуль-модели может приводить к ошибочным результатам. В свое время разработка нейтральной нуль модели оказалась исключительно продуктивной в популяционной генетике и, позже, в экологии сообществ; сейчас тот же процесс происходит в генетике раковых заболеваний. Полагаю, что результаты этой работы важны для утверждения этой парадигмы в иммунологии. Работа, безусловно, является научно новой, а её результаты будут широко востребованы.

**Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.** Все положения и выводы диссертации обоснованы точностью методов и большим объемом исследованного материала. Так, выявленный избыток общих клонотипов между близнецовыми донорами не вызывает сомнения. Интерпретация этого избытка, предлагаемая автором (пренатальный обмен Т-лимфоцитами), также выглядит наиболее правдоподобной, хотя, строго говоря, она не единственная. Использование явной модели сборки, являющееся безусловной силой данной работы, позволяет явно увидеть также и ее ограничения. На мой взгляд, важнейшее ограничение метода выявления пренатального обмена Т-

клеточными клонами, предложенного автором, в том, что лежащая в его основе модель предполагает мультипликативность, т.е. частичную независимость между событиями при сборке. Действительно, модель предполагает, например, что вероятность делеции данной длины при сборке зависит только от выбора смежного с ней сегмента и не зависит от выбора остальных сегментов; а распределение длин инсерций вовсе не зависит от выбора сегментов (ур-я 3 и 4). Если в реальности эти предположения неверны, например – если эндонуклеаза, вызывающая делеции, и/или дезокинуклеотидилтрансфераза, вызывающая вставки, имеют различную аффинность к разным нуклеотидным последовательностям, то вероятности сборки клонотипов, полученные с использованием этой модели, могут отклоняться от реальных. Если эти отклонения от независимости определяются генетически, например – вероятность выбора длины инсерции при выборе данного смежного сегмента более сходна у близнецов, чем у неродственных доноров, то это может приводить к завышению оцененной корреляции в составе репертуаров между близнецами и к ошибочным выводам. Возможность такого сценария косвенно подтверждается сходством между нефункциональными репертуарами V-сегментов бета-цепи у близнецов (с. 23).

В контексте данной работы вывод о пренатальном обмене клонами подтверждается также рядом других анализов (разделы 4.5.2-4.5.3, 4.6), а также большой силой наблюдаемого эффекта (рис. 13), поэтому маловероятно, что результаты целиком объясняются этим механизмом. Тем не менее, при наличии достаточного объема данных интересно было бы напрямую проверить предположение о независимости этапов сборки нефункциональных клонотипов друг от друга. Также интересно было бы проверить напрямую другие предположения модели, в том числе – о полном отсутствии отбора на нефункциональные клонотипы (содержащие сдвиг рамки считывания или стоп кодон). Альтернативный подход, который позволил бы подтвердить гипотезу о пренатальном обмене – сравнение репертуаров дихоральных однояйцевых близнецов, для которых постулируемый механизм обмена невозможен.

### **Заключение**

Приведенные ограничения метода не снижают ценность работы. Диссертация М.В. Погорелого представляет собой полноценную завершённую научно-исследовательскую работу. Автореферат полноценно и достоверно отражает содержание диссертации, выводы работы хорошо обоснованы и подкреплены фактическим материалом. Таким образом, диссертационная работа М.В. Погорелого «Анализ вклада

