

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Комеч Екатерины Александровны «Сравнительный анализ индивидуальных репертуаров Т-клеточных рецепторов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

### Актуальность исследования

Диссертационная работа Екатерины Александровны Комеч посвящена изучению клонального репертуара рецепторов Т клеток в организме больных с тяжелыми артропатиями, а также поиску клонов Т клеток, ассоциированных с деструктивным воспалением суставов позвоночника, может быть, даже ответственных за это воспаление при болезни Бехтерева, псориазе, реактивных артритах при некоторых инфекциях.

Выбранные диссертантом болезни считаются аутоиммунными. Медицина объясняет воспаление суставов агрессивной атакой Т клеток против собственных тканей. Строгих доказательств и научных знаний, подтверждающих такое представление в настоящее время нет. Именно поэтому работа Е.А.Комеч актуальна и интересна. Она нацелена на открытие молекулярных и клеточных механизмов тяжелых артропатий, и такие открытия рано или поздно приведут к созданию новых методов лечения. Не эмпирических или симптоматических, а основанных на точном научном знании и понимании патологического процесса.

### Содержание работы

Диссертационная работа изложена на 110 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка использованной литературы, включающего 222 ссылки. Работа содержит 24 рисунка и 8 таблиц.

В Обзоре литературы Е.А.Комеч очень хорошо описывает предшествующий уровень знания в области изучения клонального разнообразия Т клеток человека, современных методов его изучения, современных представлений о формировании репертуаров в тимусе, об их изменении в течение жизни, в процессе реагирования на вторжение инфекций. Диссертант подробно рассматривает в обзоре то, что известно о так называемых аутоиммунных заболеваниях, какие существуют объективные сведения о возможных механизмах инициации и развития таких болезней, какие в настоящее время применяются терапевтические подходы, в какой мере они эффективны. Обзор литературы показывает, что Е.А. Комеч отлично владеет современными знаниями в своей области молекулярной иммунологии.

Методы исследования, использованные в работе, соответствуют самому передовому, мировому, уровню изучения репертуаров TCR. Иммунная сортировка клеточных популяций по

выбранным маркерам, самые аккуратные и деликатные методики выделения РНК, приготовления библиотек кДНК, молекулярного бар-кодирования, амплификации целевого продукта и прочтения последовательностей на платформе Illumina с последующим применением программного обеспечения, которое позволяет удалять ошибки полимеразы, ошибки прочтения, контаминацию в Illumina<sup>®</sup>. В целом, методический уровень работы высокий, позволяющий получать лучшие по качеству и надежности данные на современном уровне развития этой науки. Биоинформатический и статистический анализы полученных результатов не вызывают сомнений и гарантируют достоверность полученных данных.

Особо следует отметить обстоятельство и аккуратность реконструкции репертуаров Т-клеточных рецепторов. Диссертант использовала оригинальный протокол подготовки библиотек кДНК. Сначала при синтезе кДНК были использованы олигонуклеотиды, комплементарные константным сегментам альфа- и бета-цепей TCR. Одновременно с 5'-конца вводили универсальный адаптер, который позволял амплифицировать библиотеки кДНК с использованием одной пары праймеров. На этой же стадии в каждую молекулу кДНК вводился уникальный молекулярный баркод в виде вырожденной последовательности 12-14 нуклеотидов, что позволяло при последующей биоинформатической обработке результатов секвенирования устранить ошибки, возникшие в ходе ПЦР или секвенирования, а также аккуратно оценивать численность каждого клонотипа без искажений, возникших из-за неравномерности ПЦР-амплификации. Амплификацию кДНК в ПЦР проводили в два этапа. На втором этапе ПЦР в кДНК библиотеку каждого образца был введен дополнительный индекс образца, что позволяло надежно определять последовательности, соответствующие конкретному образцу. Полученные библиотеки кДНК TCR секвенировали с использованием специальных праймеров чтения на платформе Illumina по 100-150 нт с обоих концов.

Индивидуальные репертуары Т-клеток реконструировали из данных секвенирования в несколько биоинформатических стадий. Во-первых, общий массив последовательностей разделяли на образцы по двум образец-специфическим индексам. Затем проводили корректирование ошибок ПЦР-амплификации и секвенирования, используя UMI и программное обеспечение MiGEC. Последовательности, прочитанные минимум дважды по результатам анализа UMI, отбирали для дальнейшего анализа, что позволило исключить большинство ошибочных последовательностей. Наконец, с помощью программного обеспечения MiXCR экстрагировали последовательности CDR3 (антиген-распознающий домен TCR), определяли V-, D-, J-сегменты TCR и составляли список клонотипов каждого образца.

Описанный протокол анализа Т-клеточных рецепторов был применен для исследования образцов периферической крови и синовиальной жидкости 31 больного анкилозирующим спондилоартритом и 12 больных псориатическим артритом. В качестве контрольных исследованы 8 образцов периферической крови здоровых доноров. В общей сложности, автор реконструировала 208 клональных репертуаров  $\beta$ -цепей и 7 клональных репертуаров  $\alpha$ -цепей TCR.

## Научные результаты работы и их новизна

В диссертационной работе Е.А.Комеч получено множество приоритетных научных данных. Впервые проведено глубокое исследование репертуаров Т клеток больных анкилозирующим спондилоартритом. Представлены данные о разнообразии TCR-клонотипов Т клеток, циркулирующих в крови больных анкилозирующим спондилоартритом. Исследовано количество различных клонотипов и представленность каждого из 50 тысяч топовых клонотипов в крови. По этим параметрам репертуар TCR крови больных анкилозирующим спондилоартритом оказался таким же, как и крови здоровых доноров соответствующего возраста.

Поскольку заболевание анкилозирующим спондилоартритом сцеплено с экспрессией молекул HLA-B27 на клетках больного, Е.А. Комеч сравнила клональное разнообразие Т клеток в крови HLA-B27-позитивных и HLA-B27-негативных индивидуумов. И в этом случае достоверных различий между сравниваемыми выборками диссертант не обнаружила.

Впервые Е.А. Комеч исследовала распределение частот использования V-сегментов как доли клонотипов с определенным V-сегментом от всех клонотипов и экстраполировала эти данные на относительное содержание в Т-клеточной популяции клеток, в рецепторах которых используется определенный V-сегмент TCR. Диссертант сравнила образцы периферической крови HLA-B27-позитивных и HLA-B27-негативных людей по распределению частот V-сегментов в репертуарах всех Т-клеток, а также во фракциях CD4 Т клеток и CD8 Т клеток. И этот сравнительный анализ тоже не выявил каких-либо особенностей репертуара Т клеток крови больных анкилозирующим спондилоартритом и индивидуумов, позитивных по HLA-B27.

Впервые при сравнении всех клонотипов Т-клеточных рецепторов в крови больных анкилозирующим спондилоартритом со всеми клонотипами TCR в крови здоровых доноров диссертант обнаружила клонотип β-цепи, в котором CDR3 построен из сегментов V9 и J2-3 со вставкой из четырех аминокислотных остатков VGLY (TRBV9\_CASSVGLYSTDTQYF\_TRBJ2-3). Оказалось, что этот клонотип значительно чаще используется у больных анкилозирующим спондилоартритом по сравнению со здоровыми людьми.

Впервые у 25 больных анкилозирующим спондилоартритом, а также у 7 здоровых HLA-B27-положительных и 7 здоровых HLA-B27-отрицательных субъектов А.Е. Комеч оценила вероятность сборки аминокислотной последовательности CDR3 клонотипов TCR, в которых использована комбинация сегментов TRBV9 и TRBJ2-3. В результате диссертант обнаружила 8 клонотипов, которые присутствовали у достоверно большего количества доноров, чем это можно было ожидать, исходя из их вероятности "сборки". Семь из обнаруженных клонотипов были высокогомлогичными, различались между собой 1-2 аминокислотными остатками и обнаруживались только у больных анкилозирующим спондилоартритом. Эти ассоциированные с анкилозирующим спондилоартритом клонотипы включали в себя и клонотип

TRBV9\_CASSVGLYSTDTQYF\_TRBJ2-3, который был обнаружен диссертантом в предшествующем разделе работы.

Впервые диссертант показала, что семь обнаруженных ею клонотипов  $\beta$ -цепи TCR, ассоциированных с анкилозирующим спондилоартритом, представлены на CD8 Т клетках, а восьмой обнаруженный клонотип TCR – представлен на CD4 Т клетках. Один из найденных клонотипов был обнаружен во фракции активированных CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Т клеток в периферической крови больного анкилозирующим спондилоартритом в начале фазы обострения заболевания и спустя 2 мес.

Впервые Е.А. Комеч определила численность ассоциированных с анкилозирующим спондилоартритом клонотипов TCR в периферической крови больных анкилозирующим спондилоартритом и в крови здоровых доноров. Оказалось, что ассоциированные с анкилозирующим спондилоартритом клонотипы довольно редкие. В среднем, их частота составляет  $10^{-4}$  в популяции Т клеток периферической крови больных, что в 300-400 раз меньше частоты наиболее часто представленных клонотипов TCR. В крови HLA-B27-позитивных здоровых доноров, во фракции TRBV9-позитивных Т клеток из периферической крови диссертант обнаружила 4 ассоциированных с анкилозирующим спондилоартритом клонотипа. Частота этих клонотипов у здоровых доноров была в 100-10000 раз ниже их содержания в крови больных анкилозирующим спондилоартритом.

Особенно интересные результаты были получены Е.А.Комеч при изучении материала из суставов, пораженных воспалением. Диссертант показала, что обнаруженные ею в крови клонотипы, ассоциированные с анкилозирующим спондилоартритом, присутствуют в синовиальной жидкости воспаленных суставов у больных анкилозирующим спондилитом и псориатическим артритом.

Анализ репертуаров Т клеток показал, что разнообразие клонов Т-клеток в синовиальной жидкости было достоверно ниже, чем в парных образцах периферической крови тех же пациентов, как в тотальной фракции Т-клеток, так и во фракциях CD4 и CD8 субпопуляций. Репертуары всех исследованных образцов Т-клеток синовиальной жидкости оказались более олигоклональными, чем репертуары периферической крови тех же доноров. Автор видит в этом результате подтверждение экспансии определенных клонов Т клеток в ткани воспаленных суставов.

Сравнение Т-клеточных репертуаров по частоте использования V-сегментов TCR показало, что репертуары двух независимых образцов крови одного пациента всегда более похожи между собой (ближе по расстоянию Дженсена-Шеннона) по сравнению с парными образцами крови и синовиальной жидкости. Этот факт диссертант тоже рассматривает как свидетельство клональной экспансии значительного числа клонов Т клеток в синовиальной жидкости.

Впервые в диссертации Е.А.Комеч идентифицированы клонотипы TCR, ассоциированные с анкилозирующим спондилоартритом и накапливающиеся в синовиальной жидкости воспаленных суставов. Диссертант обнаружила в пораженных суставах семейство 16 высокомолекулярных последовательностей CDR3 бета-цепей TCR, образованных сегментами TRBV9 и TRBJ2-3. Это оказалось то же самое семейство, представителями которого были 4

гомологичные последовательности TRBV9/TRBJ2-3, обнаруженные диссертантом в крови больных анкилозирующим спондилитом. Диссертант установила, что такие ассоциированные с анкилозирующим спондилоартритом клонотипы представлены рецепторами CD8 Т клеток HLA-B27-позитивных больных. Впервые определена частота этих клонотипов, ассоциированных с анкилозирующим спондилоартритом. В синовиальной жидкости частота Т клеток с TCR, относящимися к этим клонотипам, составляла  $10^{-3}$  от CD8 Т клеток. Ассоциированные с анкилозирующим спондилоартритом клонотипы CD8 Т клеток не были самыми многочисленными в популяции Т клеток синовиальной жидкости больных. У большинства исследованных пациентов численность ассоциированных с анкилозирующим спондилоартритом клонотипов была в 50-100 раз меньше самых многочисленных клонотипов.

Диссертант показала, что ассоциированные с анкилозирующим спондилоартритом клонотипы имеются и в синовиальной жидкости всех HLA-B27-позитивных пациентов с псориатическим артритом, но они не обнаруживаются у HLA-B27- негативных больных с тем же диагнозом. Все выявленные клонотипы были обнаружены исключительно в репертуарах образцов CD8 Т клеток и их содержание оказалось достоверно обогащено в синовиальной жидкости по сравнению с периферической кровью пациентов с псориатическим артритом.

Впервые в диссертации проведен поиск клонотипов TCR с известной антигенной специфичностью в образцах крови и синовиальной жидкости больных с реактивным артритом. Для этого была использована база последовательностей переменных доменов альфа- и бета-цепей TCR с известной специфичностью, созданная при непосредственном участии Е.А. Комеч. Эта база включает больше 20 тысяч последовательностей альфа- и бета-цепей TCR человека.

У некоторых исследованных пациентов диссертант обнаружила десятки клонотипов с известной антигенной специфичностью. Три самых высокопредставленных среди обнаруженных клонотипов были известны в базе данных как TCR, распознающие пептиды вируса Эпштейна-Барр. Частота этих клонотипов среди Т-клеток синовиальной жидкости составляла  $10^{-2}$ - $10^{-3}$ , и они находились в первой десятке самых крупных по численности клонотипов в Т-клеточной популяции синовиальной жидкости воспаленного сустава.

В диссертации исследована динамика клональных репертуаров Т-лимфоцитов у больных анкилозирующим спондилоартритом в ходе терапевтической аутологичной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Показано, что практически все высокопредставленные клонотипы первоначального репертуара сохраняются после трансплантации и обнаруживаются через 2 года после нее.

#### Научное и практическое значение результатов работы

В диссертационной работе получено значительное количество новых научных данных о репертуарах Т-клеток в крови и синовиальной жидкости больных анкилозирующим спондилоартритом и псориатическим артритом. Эти принципиально новые сведения представляют большое значение для фундаментальной науки.

В частности, ценны сведения о частоте и разнообразии клонотипов TCR, о неравномерном использовании V- и J-сегментов генов TCR. Очень важны и интересны данные о том, что разнообразие TCR Т клеток в воспаленном суставе вполне сравнимо с разнообразием Т клеток в периферической крови. Это доказывает отсутствие селективной миграции каких-то определенных клонотипов Т клеток в зону воспаления, что является важнейшим фундаментальным знанием.

Чрезвычайно интересны и полезны знания, добытые диссертантом, о клонотипах, ассоциированных с анкилозирующим спондилоартритом и псориатическим артритом. Автор расшифровала структуру CDR3 этих клонотипов, показала их представленность на CD8 Т клетках и ассоциацию с HLA-B27. Эти сведения имеют большое значение для понимания патогенеза анкилозирующего спондилоартрита и псориатического артрита у HLAB27-позитивных больных.

Несмотря на то, что антигенную специфичность обнаруженных клонотипов TCR еще предстоит изучить, открытие их структуры и высокий уровень гомологии 16 ассоциированных с указанными болезнями клонотипов TCR позволяют уже сейчас ресинтезировать их, и использовать для диагностики, а также создания принципиально новых вариантов лечения анкилозирующего спондилоартрита и псориатического артрита.

#### Вопросы и замечания

##### *По обзору литературы:*

- Аргументы в пользу идеи «артритогенного пептида» (стр 33-34) неубедительны.
- Не ясно, каким образом экспрессируются гомодимеры HLA-B27 у нокаутов по  $\beta_2$ -микроглобулину (стр. 35), поскольку известно, что белки HLA класса I в отсутствие  $\beta_2$ M не выводятся на клеточную поверхность.
- Не ясно, каким образом гомодимеры HLA-B27 могут активировать CD4 Т клетки (стр. 35), поскольку CD4 взаимодействуют с белками HLA класса II, но не класса I.
- Не вполне понятно, почему пернициозная анемия отнесена к аутоиммунным заболеваниям (стр. 37).

##### *По методической части:*

- Следовало бы указать (стр. 43), каким было содержание CD34-положительных клеток в аутотрансплантате и сколько пришлось ввести белых клеток крови, чтобы достичь дозы 2,4 млн. стволовых клеток.

##### *По результатам:*

- В стадии обострения анкилозирующего спондилоартрита исследован клональный состав фракции CD38<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup> Т клеток периферической крови (стр. 63). Было бы полезно представить данные об относительном содержании таких активированных Т клеток до и во время обострения болезни, то есть на момент изучения клонального репертуара этих клеток.

- Рис. 10А (стр. 63) – надпись «Полный репертуар Т лимфоцитов» не вполне соответствует тому, что здесь представлены наличие и частота 8 обнаруженных автором клонотипов TCR, ассоциированных с анкилозирующим спондилоартритом.
- Стр. 67 – сравнение Т-клеточных репертуаров в периферической крови и синовиальной жидкости следовало делать с учетом того, наивные Т клетки не выходят из циркуляции в ткани. Это означает, что более корректным было бы сравнивать фракцию наивных Т клеток крови и Т клеток синовиальной жидкости.
- Стр. 66 – переводить частоты клонотипов TCR, определенные по РНК, в частоты Т клеток, экспрессирующих такие клонотипы, нужно с осторожностью, поскольку уровни экспрессии мРНК TCR в разных Т клетках могут существенно различаться.
- Рис. 15 – представлены аминокислотные последовательности обнаруженных диссертантом клонотипов CDR3, ассоциированных с анкилозирующим спондилоартритом. Полезно было бы представить и нуклеотидные последовательности тем более, что дальше автор сообщает о различных нуклеотидных реализациях, кодирующих эти фрагменты TCR.

Перечисленные замечания и вопросы ни в коей мере не умаляют достоинств и достижений работы. Они имеют характер пожеланий. Диссертационная работа Е.А. Комеч – сильная, современная, содержательная и очень интересная научная работа, которая представляет собой новое решение актуальной научной задачи «Сравнительный анализ индивидуальных репертуаров Т-клеточных рецепторов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями».

Диссертационная работа Екатерины Александровны Комеч 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 диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Атауллаханов Равшан Иноятович,  
 доктор медицинских наук, профессор,  
 руководитель лаборатории активации иммунитета  
 Федерального Государственного бюджетного учреждения  
 «Государственный научный центр «Институт иммунологии»  
 Федерального медико-биологического агентства  
 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24, корп. 2  
 тел.: (903) 5891732  
 ravshan.ataullakhanov@gmail.com

*14 октября 2019*

