

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Путинцевой Екатерины Викторовны «Разнообразии репертуаров Т-клеточных рецепторов человека и его изменения в ходе старения», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»

Актуальность работы

Диссертационное исследование Е.В.Путинцевой выполнено в одной из самых активно развивающихся областей молекулярной иммунологии. Оно имеет целью изучение структурного разнообразия Т-клеточных рецепторов человека.

Более полувека подавляющее большинство иммунологов придерживается фундаментальной догмы о клональной организации лимфоидной ткани, согласно которой огромное множество лимфоцитов (в организме человека их около триллиона) состоит из небольших клонов клеток, различающихся оригинальностью своих рецепторов к антигену. Это разнообразие рецепторов обеспечивает возможность распознать практически любой антиген, а распознавшие клетки размножаются и защищают нас от того самого чужого, что они распознали. Теория клональной организации и адаптивного ответа на антиген силами ограниченного клона клеток нужной антигенной специфичности составляет важнейшую основу наших представлений о системе иммунитета и принципах ее реагирования. Вместе с тем, прямых доказательств правильности этой теории немного.

Сама клональная организация не вызывает сомнений. Давно исследователи научились получать клоны Т-клеток, изучили многие их свойства, в том числе, нуклеотидную последовательность гена Т-клеточного рецептора и аминокислотную последовательность самого рецептора. Действительно, каждый клон обладает оригинальным по структуре рецептором. Причем, общее строение молекулы довольно консервативно, различия между клонами касаются нескольких небольших петель N-концевого домена, который по этой причине и называется варибельным.

Несмотря на указанные успехи, исследователям удается, в лучшем случае, прочесть десятки структур рецептора Т-клеток. Этого совершенно не достаточно для создания представлений о реальном разнообразии Т-клеточных рецепторов в организме человека. В последнее десятилетие для изучения разнообразия были применены различные методы, но ни один из них не позволял даже приблизиться к его реальной оценке. До недавнего времени можно было лишь догадываться о размерах каждого клона, практически не было объективных данных о многочисленности клонов и вариациях размеров каждого клона. Не было реальных технологий для количественного исследования клонального репертуара лимфоцитов, вообще, и Т-лимфоцитов, в частности. И эти знания были недоступными.

Ситуация резко изменилась несколько лет назад, когда для изучения рецепторного репертуара лимфоидных клеток начали применять технологии секвенирования нового поколения (new generation sequencing). С началом применения этих технологий стали появляться работы, описывающие количественное разнообразие антиген-распознающих рецепторов В-клеток и, вслед за этим, Т-клеток.

Работа Е.В.Путинцевой выполнена в коллективе Д.М.Чудакова, который является одним из лидеров в этой области науки, одним из первых применил новые технологии глубокого секвенирования для прочтения и анализа репертуаров Т-клеточных рецепторов. Новым и актуальным является практически все, что делается в этом направлении. Все, что базируется на здоровой логике и стремлении понять основы клонального устройства, а также его изменения в физиологических и патологических ситуациях. Не является исключением и диссертационная работа Е.В.Путинцевой. Она посвящена чрезвычайно актуальным и важным вопросам разнообразия Т-клеточных рецепторов человека, связи этого разнообразия с генами МНС, продукт которых является лигандом Т-клеточных рецепторов, а также изучению изменений разнообразия рецепторов Т-клеток в процессе старения.

Цели работы четко сформулированы автором. Они состоят в анализе индивидуального репертуара β -цепей Т-клеточных рецепторов человека и изучении влияния на него наследственных факторов и старения.

Основные результаты работы:

- Проведен анализ репертуаров β -цепи Т-клеточных рецепторов трех родственных групп, а также 39 доноров разных возрастов на рекордной глубине секвенирования – от 500 000 до 1 900 000 клонотипов, идентифицированных в образцах периферической крови каждого из изучаемых индивидуумов.
- Детально описан индивидуальный репертуар Т-клеточных рецепторов человека и, в частности, количество различных клонотипов, размеры клонов, отношение больших и малых по размеру клонов. Показано, что малые клоны представлены несколькими клетками, которые обеспечивают наибольшее разнообразие в популяции наивных Т-клеток.
- Проведено сравнение репертуаров Т-клеточных рецепторов родственных и не родственных индивидов. Последовательности со сбитой рамкой считывания и неправильно расположенным стоп-кодоном позволили автору исследовать частоту использования различных V β -сегментов при генерации Т-клеточных рецепторов во вновь возникающих в тимусе наивных Т-клетках. А частота использования V β -сегментов с правильной рамкой считывания показывала влияние селекционного отбора в тимусе. Эти данные позволили автору установить, что частота использования различных V β -сегментов при сборке транскодона Т-клеточного рецептора не отличается у родственных и неродственных пар мама-ребенок. Напротив, частоты использования V β -сегментов в репертуаре наивных Т-лимфоцитов, прошедших селекцию в тимусе, достоверно ближе у родственных пар.
- Впервые на аминокислотном и нуклеотидном уровнях проведен глубокий сравнительный анализ репертуаров последовательностей CDR3 TCR β для родственных и неродственных пар мама-ребенок. Показано, что степень пересечения репертуаров у родственных пар такая же, как у неродственных.
- При этом для любых двух индивидуумов установлена высокая степень пересечения репертуаров CDR3 TCR β . Это пересечение (совпадение последовательностей CDR3) наблюдается преимущественно на уровне высокочастотных клонотипов. При сравнении последовательностей CDR3 в репертуарах двух любых людей выявляется до 40%

совпадений по аминокислотным последовательностям и до 5-10% по нуклеотидным последовательностям (от общего индивидуального разнообразия).

- Обнаружено, что селекция в тимусе снижает среднюю длину CDR3 петли в β -цепи T-клеточного рецептора человека.
- На основе молекулярного баркодирования библиотек разработан метод, который позволяет корректно и глубоко сравнивать разнообразие репертуаров CDR3 TCR β образцов, полученных от различных пациентов, в условиях разного количества клеток на старте, разного качества РНК, и разной глубины секвенирования.
- С использованием разработанного метода показано, что относительное разнообразие репертуара CDR3 TCR β составляет ~500-600 тысяч клонотипов на 1 млн T-лимфоцитов у детей, но с возрастом линейно снижается до ~300 тысяч клонотипов на 1 млн T-клеток к 70-80 годам. Экстраполяция на весь организм человека позволила автору оценить общее разнообразие β -цепи TCR порядком 7 млн вариантов у детей и ~2,5 млн вариантов у пожилых людей.

Новизна и обоснованность полученных результатов

Полученные в диссертационной работе научные данные являются принципиально новыми научными фактами. Данные массивного секвенирования анализировались современными методами биоинформатики и статистики, корректно описаны, хорошо и наглядно проиллюстрированы и не вызывают сомнений. Выводы соответствуют полученным результатам.

Значение полученных данных для науки

Выше были перечислены полученные Е.В.Путинцевой новые данные о структурном разнообразии β -цепи TCR и особенно ее CDR3-фрагмента, о вкладе в это разнообразие рекомбинационных процессов в геноме возникающих в тимусе T-клеток, о влиянии последующей селекции в тимусе, о значении MHC-генотипа и о возрастных изменениях репертуара. Все эти сведения являются новым фундаментальным знанием иммунологии. Они, несомненно, будут высоко оценены научным сообществом и войдут в учебники и справочники по иммунологии.

Феноменально интересным считаю описанный в работе факт совпадения 5% нуклеотидных и 40% аминокислотных последовательностей CDR3 TCR β при сравнении двух любых людей. До сих пор считалось, что генетический конструктор, собирающий транскодон TCR из разрозненных сегментов, является генератором разнообразия, которое увеличивается на порядки за счет небольших вставок и делеций на стыке сегментов. Потенциальное разнообразие TCR, которое может создавать такой генетический генератор, оценивается порядком 10^{18} , то есть заведомо больше, чем количество T-клеток. В свете таких представлений совершенно неожиданны новые данные, представленные в диссертации Е.В.Путинцевой, о том, что в этом генераторе разнообразия имеется пока не известный механизм, который с очень высокой частотой создает одинаковые последовательности β -цепи TCR у разных людей.

Большое научное и практическое значение имеет развитый в диссертационной работе методический подход – глубокое массивное секвенирование TCR с использованием молекулярного бар-кодирования библиотек РНК. Он позволяет корректно и глубоко сравнивать разнообразие репертуаров образцов, полученных от разных доноров, в условиях разного количества клеток на старте, разного качества РНК и разной глубины секвенирования. Уверен, что использование этого метода принесет еще много новых знаний о разнообразии Т-клеточных рецепторов.

Замечания

- В работе исследуется репертуар рецепторов Т-клеток периферической крови. Принимая во внимание рециркуляцию лимфоцитов между кровью и лимфоидными органами, автор подразумевает, что циркулирующий пул клеток в точности отражает свойства лимфоидных клеток во всем организме. Возможно, это и так, но может быть и иначе. Например, имеются веские основания считать, что лимфоидные клетки в разных состояниях и фазах дифференцировки — наивные, активированные и клетки «памяти» — существенно различаются путями рециркуляции и тропностью к органам и тканям. Вполне возможно, что активированные клетки совсем недолго пребывают в крови и уходят в места воспаления. Клетки «памяти», несомненно, циркулируют, но их большая часть собирается в так называемых «нишах» костного мозга, где они могут сохраняться в течение десятилетий. Совсем не исключено существование оседлого пула лимфоидных клеток, постоянно проживающих в каких-то тканях, например, в пограничных эпителиях. Иными словами, я допускаю неравномерность распределения репертуаров Т-клеток между органами и кровью. Такую возможность следует учитывать и, при возможности, исследовать, а в диссертации и публикациях отмечать, что представлены данные о репертуаре циркулирующего пула Т клеток.
- При сравнении репертуаров двух людей, наряду с относительным содержанием низкочастотных и высокочастотных клонотипов, было бы полезным сравнивать абсолютное количество клеток, представляющих клонотипы. В частности, это необходимо делать при существенных различиях абсолютного количества лимфоцитов у двух сравниваемых индивидов, например, у матери и ребенка.
- Важно в будущем оценить вклад антигенных нагрузок в формирование разнообразия репертуаров TCR, а также генерацию идентичных последовательностей TCR, совпадающих у разных людей. В этой связи, были бы интересны данные о public последовательностях CDR3 и TCR β в лимфоцитах пуповинной крови, что должно отражать разнообразие и совпадение секвенсов в отсутствие антигенных стимулов из внешнего мира.
- Крайне интересным было бы дальнейшее изучение механизмов генерации идентичных последовательностей TCR у разных индивидов и определение антигенной специфичности таких public TCR.
- В связи с обнаруженными различиями изменений пулов CD4 и CD8 Т-клеток при старении было бы интересно установить причины такой дивергенции двух типов Т-клеток.

Представленные замечания ни в коей мере не умаляют достоинств диссертационной работы, они имеют характер рекомендаций на будущее.

Заключение

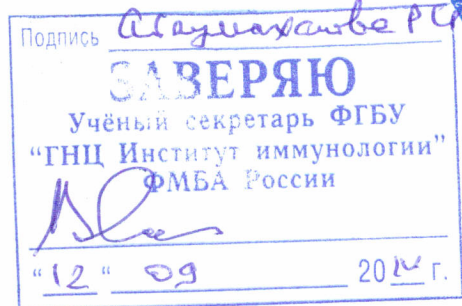
На основе изучения диссертации и опубликованных работ по теме диссертации, я могу заключить, что диссертационная работа Путинцевой Е.В. актуальна по теме и является логически завершенным исследованием, выполненным на современном экспериментальном уровне. Основные научные результаты диссертационной работы получены впервые и опубликованы в ведущих рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК РФ. Достоверность и обоснованность полученных результатов, научных положений и выводов не вызывает сомнений.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. В нем правильно отражены основные идеи и выводы диссертации, новизна и практическая значимость результатов исследований.

Все, изложенное выше, позволяет заключить, что по актуальности, новизне, уровню выполнения и научной значимости диссертационная работа Путинцевой Екатерины Викторовны «Разнообразие репертуаров Т-клеточных рецепторов человека и его изменения в ходе старения» соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям. Диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842) для ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Атауллаханов Равшан Иноятович,

доктор медицинских наук, профессор,
руководитель отдела иммунной биотехнологии,
заведующий лабораторией активации иммунитета
ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии ФМБА РФ»



Контактная информация:

Почтовый адрес: 115478, г. Москва,

Каширское шоссе, д. 24, корп. 2,

Отдел иммунной биотехнологии

E-mail: ravshan.ataullakhanov@gmail.com