

## ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу **Минервиной Анастасии Алексеевны**

«Мониторинг адаптивного иммунного ответа человека при вакцинации против желтой лихорадки», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Представленная к защите работа Минервиной А.А. посвящена анализу Т-клеточного компонента адаптивного иммунного ответа на острую вирусную инфекцию. На классической модели вакцинного штамма вируса желтой лихорадки (ЖЛ) изучены динамика, клональный состав и антигенная специфичность субпопуляций Т-лимфоцитов, возникающих в ответ на первичную и вторичную иммунизацию. Новизну и актуальность данной работе придает использование самых современных методов молекулярной и клеточной биологии. Методическую основу работы составляет высокопроизводительное секвенирование репертуаров  $\alpha$  и  $\beta$ -цепей Т-клеточных рецепторов (TCR, от англ. "T-cell receptor") различных субпопуляций Т-клеток и продвинутое методы анализа полученных таким образом данных, в том числе разработанные автором в ходе выполнения работы. Результаты, полученные Минервиной А.А. и соавторами, позволяют рассмотреть классическую картину адаптивного антивирусного ответа на новом уровне высокой молекулярной детализации. Такое рассмотрение имеет очевидное фундаментальное значение, поскольку многие закономерности Т-клеточного иммунитета, ранее известные на феноменологическом уровне, становятся понятны с точностью до конкретных нуклеотидных последовательностей и аминокислот, которые они кодируют. Работа также имеет большой практический потенциал, поскольку перспективы персонализированной терапии целого ряда социально значимых патологий включают в себя анализ поведения специфических клонотипов Т-клеток и манипуляции с ними (обогащение или активацию для лечения рака, удаление или подавление в случае аутоиммунных болезней). Очевидно, что подходы и алгоритмы, разработанные в данной работе, будут крайне востребованы персонализированной медициной будущего.

Задачи диссертационной работы Минервиной А.А. направлены на реконструкцию и анализ динамики репертуаров TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , а также HLA типирования по оригинальной методике, доноров, получивших вакцинный штамм вируса ЖЛ, на основе данных глубокого секвенирования целевых и тотальных библиотек кДНК из мононуклеаров периферической крови, отсортированных субпопуляций Т-лимфоцитов и отдельных клеток. На основании полученных данных были идентифицированы клонотипы, отвечающие на иммунизацию, проведен анализ их поведения в ходе иммунного ответа на первичную и повторную вакцинацию, изучена динамика различных субпопуляций Т-клеток памяти. Также были найдены характеристические мотивы в последовательностях TCR $\alpha$  и TCR $\beta$ , узнающих иммунодоминантный эпитоп NS4B214-222 вируса ЖЛ в контексте аллеля HLA-A02.

Работа изложена на 112 страницах, содержит 40 рисунков и 2 таблицы. Она построена по классическому принципу и включает в себя разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Благодарности», «Список сокращений» и «Список литературы». Имеется также 2 приложения с описанием синтетических олигонуклеотидов и образцов для глубокого секвенирования.

Обзор литературы занимает 1/4 от объема диссертации и включает 4 главы. Первые 2 из них посвящены современным представлениям о формировании репертуаров Т-клеточных рецепторов и методам их анализа, и по объему составляют большую часть обзора, что совершенно оправдано, поскольку молекулярная биология Т-клеточного иммунитета весьма сложна и требует обстоятельных пояснений. Автор прекрасно справляется с этой задачей, привлекая к изложению ссылки на самые современные научные публикации. Далее следует краткое описание вируса ЖЛ, и изложение известных фактов об иммунном ответе на вакцинный штамм YFV17D. Обзор литературы написан четко и лаконично, хорошо проиллюстрирован (этой задаче посвящено 7 рисунков из 40) и дает представление о предмете исследования, достаточное, чтобы даже неспециалист мог оценить его красоту и элегантность. Приятно отметить, что многие из процитированных статей выполнены с участием Минервиной А.А. и ее коллег по лаборатории, что отражает несомненный мировой уровень рассматриваемой работы.

Раздел «Материалы и Методы» по объему составляет 1/8 часть диссертации и содержит описание всех методик, использованных автором, в том числе и тех, что были впервые разработаны и опробованы в ходе данного исследования. Основное внимание уделено специфическим протоколам пробоподготовки и анализа данных. Используемые биоинформатические инструменты описаны в лаконичном стиле, понятном специалисту, однако описание снабжено необходимыми ссылками на литературу, а приведенные интернет-адреса и идентификаторы для ресурсов и данных указывают на актуальную информацию, готовую к использованию.

Раздел «Результаты и обсуждение» занимает 40 страниц (более 1/3 объема), что составляет основную часть диссертации, и состоит из 3 подразделов, первая из которых посвящена методу HLA-типирования на основе РНК. Вторая часть, самая объемная, посвящена собственно мониторингу Т-клеточного иммунного ответа на вакцинацию от ЖЛ и разделена на 15 небольших подразделов, каждый из которых описывает какой-то один методический или концептуальный аспект работы, начиная с создания коллекции образцов и секвенирования библиотек кДНК и заканчивая анализом фенотипического разнообразия клонов Т-клеток, распознающих иммунодоминантный пептид NS4B<sub>214-222</sub>. Наконец, третий подраздел посвящен идентификации клонов Т-клеток, реагирующих на ЖЛ, по аминокислотным последовательностям TCR.

Среди сделанных наблюдений и полученных результатов можно отметить данные по динамике субпопуляций Т-клеток. Очень интересно наблюдение, что Т-клеточный ответ на повторное заражение вакцинным штаммом вируса ЖЛ - на порядок более слабый, но при этом более быстрый, и захватывает в основном CD4-положительные Т-хелперы. Интересны также наблюдения по смене фенотипа клонов цитотоксических лимфоцитов. Примечательно, что для поиска в TCR репертуарах иммунореактивных клонов было разработано несколько разных подходов, среди которых особенно хочется отметить представляется метод, основанный на использовании особенностей первичной структуры TCR и статистическом моделировании вероятности их сборки, который не требует информации об антигенной специфичности клонов. Очень элегантно выглядит алгоритм для спаривания  $\alpha$  и  $\beta$ -цепей TCR на основе сходства клональных траекторий, который также не требует ничего, кроме достаточного количества образцов, полученных в разные моменты времени, качественных первичных данных и красивой статистики. Весьма ценно, что биоинформатическое спаривание  $\alpha$  и  $\beta$ -цепей TCR было валидировано прямым секвенированием транскриптомов отдельных клеток. Представляется, что разработанные методы восстановления  $\alpha\beta$  пар TCR

могут иметь особенную практическую значимость в тех клинических приложениях, где используется трансдукция Т-клеток генами, кодирующими TCR известной специфичности.

Из вышеизложенного следует, что в диссертационной работе Минервиной А.А. получены новые фундаментальные знания о динамике противовирусного Т-клеточного ответа на примере вакцины против ЖЛ, и разработан ряд оригинальных методов анализа Т-клеточных репертуаров, которые, несомненно, будут использованы в дальнейших исследованиях и могут иметь практическое значение для биомедицины. Серьезных критических замечаний работа не вызывает, можно лишь отметить некоторое количество грамматических и стилистических ошибок, отражающих недостаточно внимательное редактирование текста. Они не мешают восприятию материала и нисколько не портят прекрасного впечатления от работы. Остальные комментарии представляют собой не критические замечания, а скорее вопросы для обсуждения с автором:

1. Что известно о специфических антителах у исследованных пациентов? Демонстрировали ли они классическую картину вторичного иммунного ответа? Какие особенности антительного ответа наблюдались у пациента P1, который получил вторичную вакцинацию от ЖЛ через 30 лет после первичной?

2. В разделе 4.2.7 (Идентификация изменившихся клонов на основе индивидуальных клональных траекторий) описан анализ индивидуальных клональных траекторий ЖЛ-реактивных клонов методом главных компонент (РСА от англ. "Principal component analysis"). При этом выявляется 2 кластера клонов, только один из которых соответствует клону, идентифицированному как ЖЛ-реактивный путем поиска дифференциально-экспрессированных генов (программный пакет edgeR). Что можно сказать о втором кластере, может ли он соответствовать подмножеству клонов с уникальными свойствами? В этом же разделе на Рис. 20С можно заметить, что динамика ответа на первичную вакцинацию оказывается очень сходной при определении при помощи EdgeR и РСА, кроме начальной точки, где РСА выдает на полтора-два порядка больше ЖЛ-реактивных клонов, чем РСА, как это можно объяснить?

3. Спаривание  $\alpha$  и  $\beta$ -цепей TCR на основе клональных траекторий (раздел 4.2.8) позволяет корректно определить пары для большинства ЖЛ-реактивных клонов (как специфических, так и из тотальной популяции), однако не для всех. Что можно сказать о свойствах клонов, которые не удалось идентифицировать? Есть ли основания считать, что наиболее биологически значимые пары цепей были успешно идентифицированы? Не может ли это стать проблемой в ситуации, когда реакция не столь ярко выражена (например, в случае противоопухолевого ответа)?

4. Исходя из показанной на рисунке 22 стратегии сортировки субпопуляций Т-клеток, можно предположить, что в образце «наивной» Т-клеточной памяти (Tscm) очень мало клеток. Удалось ли собрать достаточное количество материала для анализа? Не может ли редкая встречаемость этого фенотипа среди ЖЛ-реактивных клонов быть следствием недостаточной глубины чтения?

5. В разделе 4.2.10, посвященном силе иммунного ответа на иммунодоминантный эпитоп, приводится ссылка на литературные данные о снижении экспрессии корцептора CD8 на пике активации. Наблюдалось ли подобное снижение в аналогичных экспериментах в данной работе?

6. Насколько метод идентификации клонов при помощи EdgR чувствителен к интенсивности ответа и глубине покрытия? Хватит ли у метода чувствительности для анализа, например, противоопухолевого иммунного ответа?

7. При обсуждении распределения клонов Т-клеток между фенотипами (глава 4.2.15) высказана очень интересная гипотеза о том, что фенотип клеток может служить сенсором концентрации клеток с определенным TCR, однако в выводы это не попало. Почему?

В заключении отзыва следует еще раз сказать, что работа Минервиной А.А. производит очень хорошее впечатление. Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена в научных статьях, опубликованных автором в ведущих зарубежных журналах. Результаты работы доложены на многих международных конференциях.

Таким образом, диссертация Минервиной А.А. «Мониторинг адаптивного иммунного ответа человека при вакцинации против желтой лихорадки» полностью отвечает требованиям "Положения 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), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор Минервина Анастасия Алексеевна несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник лаборатории  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук (ФГБУН ИМБ РАН),  
доктор биологических наук, профессор,  
профессор РАН, член-корр. РАН  
119991, Москва, ул. Вавилова, 32  
+7 (499) 135-9770, kuprash@eimb.ru

Купраш Дмитрий Владимирович

Подпись д.б.н., член-корр. РАН Купраша Д.В.  
«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГБУН ИМБ РАН  
к.в.н. Бочаров А.А.

8 мая 2020 г.

