



ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
«ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ»
(ФГБУ «ГНЦ ИНСТИТУТ ИММУНОЛОГИИ» ФМБА РОССИИ)

Каширское шоссе, д. 24,
Москва, 115522

от 09.04.2020 г. № 27-01/12

на № _____ от _____ 20 ____ г.

тел.: 8 499-311-67-78
8 499-617-10-27
факс: 8 499-612-81-51
E-mail: info@ncii.ru
www.ncii.ru

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России, доктор медицинских наук,
профессор, член-корреспондент РАН

_____ М.Р. Хаитов

_____ » апреля 2020 года



О Т З Ы В

ведущей организации о научно-практической значимости
диссертационной работы Минервиной Анастасии Алексеевны «Мониторинг адаптивного
иммунного ответа человека при вакцинации против желтой лихорадки», представленной на
соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
«03.01.03 – Молекулярная биология»

Актуальность темы диссертационной работы

Главная задача системы адаптивного иммунитета – специфичное распознавание и
уничтожение патогена, сопровождающееся формированием долговременной памяти.
Центральным событием развития адаптивного иммунного ответа является взаимодействие Т-
клеток с фрагментами патогена на антиген-презентирующих клетках. Это взаимодействие, в

свою очередь, обеспечено специфичным контактом Т-клеточного рецептора с комплексом МНС-пептид. Возможность этого взаимодействия определена колоссальным разнообразием Т-клеточных рецепторов. Современные технологии высокопроизводительного секвенирования дают возможность непосредственно изучать разнообразие репертуаров Т-клеточных рецепторов. Преимущество данных подходов состоит в их универсальности: они дают возможность отслеживать ответ Т клеток на любую инфекцию, вакцинацию или иммунизацию, вне зависимости от конкретных антигенов.

Репертуар TCR – динамичная система. Под воздействием антигенного стимула отдельные клоны Т-клеток увеличивают свою численность для борьбы с заболеванием и часть из них сохраняется в виде иммунной памяти. Формирование долговременной и эффективной иммунной памяти – главный критерий успешной вакцинации. Примером одной из наиболее эффективных вакцин является живая аттенуированная вакцина против желтой лихорадки. Понимание механизмов ее влияния на иммунитет, вообще, и на Т клетки, в частности, необходимо для разработки новых эффективных вакцин в будущем. Кроме того, вакцинация против желтой лихорадки представляет собой классическую модель для изучения иммунного ответа на острую вирусную инфекцию у человека. Изучение динамики и клонального разнообразия Т-клеток, отвечающих на эту вакцинацию, имеет фундаментальное значение для понимания основ формирования противовирусного иммунитета.

Соответствие темы диссертации научной специальности

Диссертационная работа А.А. Минервиной выполнена на базе ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН и посвящена исследованию изменений в репертуарах Т-клеточных рецепторов в ответ на первичную и повторную иммунизацию живой противовирусной вакциной. Тематика диссертации полностью соответствует паспорту научной специальности «03.01.03 – Молекулярная биология».

Основные результаты диссертационной работы и их достоверность

Диссертация Минервиной А.А. представляет собой хорошо спланированное исследование, предметом которого являются изменения, происходящие в репертуаре Т-

клеток после первичной и повторной вакцинации против желтой лихорадки. Целью работы было изучить динамику, клональный состав и антигенную специфичность клонов Т-клеток, отвечающих на противовирусную вакцинацию. Для достижения цели автором были поставлены задачи, которые можно разделить на технические, такие как разработка оригинальной технологии HLA-типирования на основе РНК и получение репертуаров альфа и бета-цепей TCR после вакцинации от желтой лихорадки; и содержательные, а именно, сравнительный анализ силы и динамики первичного и вторичного иммунного ответа, характеристика фенотипов клонов Т-клеток, отвечающих на вакцинацию и поиск характерных мотивов в аминокислотных последовательностях TCR, связывающих иммунодоминантный эпитоп вируса.

Все поставленные задачи были успешно выполнены диссертантом. В ходе выполнения исследования соискателем получено 200 библиотек репертуаров альфа- и бета-цепей TCR различных подтипов Т-лимфоцитов периферической крови в различных временных точках после первичной и повторной вакцинаций от желтой лихорадки. С помощью сравнения количества Т-клонов в точках до и после вакцинации определены клоны, значимо увеличившие концентрацию в ответ на иммунизацию. Для этих клонов определена степень клональной экспансии, исследована динамика экспансии этих клонов в процессе первичного и вторичного иммунного ответа на вакцину. Прослежено формирование различных подтипов клеток памяти после вакцинации, как с использованием стандартных маркеров для цитофлуориметрии, так и с использованием секвенирования транскриптомов единичных клеток через 1,5 года после вакцинации. Восстановлены парные репертуары альфа-бета TCR клонов, связывающих иммунодоминантный эпитоп вируса желтой лихорадки и описаны характерные последовательности в TCR, обеспечивающие связывание этого пептида. На основе анализа аминокислотных последовательностей TCR разработан оригинальный подход для поиска клонов, активно-участвующих в иммунном ответе.

Достоверность полученных результатов подтверждена с использованием биологических реплик и параллельным анализом репертуаров альфа- и бета-цепей TCR. Специфичность клонов, отвечающих на вакцинацию клональной экспансией, дополнительно подтверждена при помощи анализа антиген-связывающих Т клеток методом проточной

цитофлуориметрии с МНС-мультимером, нагруженным иммунодоминантным пептидом. Все результаты исследования получены с использованием корректных статистических методов.

Структура диссертации соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Значительный вклад диссертанта на всех этапах выполнения исследования не вызывает сомнений.

Научная новизна работы

С помощью высокопроизводительного секвенирования репертуаров TCR и оригинального биоинформатического подхода в диссертационной работе А.А. Минервиной в периферической крови каждого вакцинированного были обнаружены сотни TCR альфа- и TCR бета-клонотипов, отвечающих на вакцинацию против желтой лихорадки. Впервые показано, что при повторной вакцинации даже через 30 лет после первичной, общее количество клонотипов, увеличивающих свою концентрацию после вакцинации, и занимаемая ими доля в репертуаре значительно ниже, чем у доноров, вакцинированных впервые. Показано, что пик вторичного T-клеточного иммунного ответа наступает на 5 или даже 10 дней раньше, чем пик первичного иммунного ответа. Анализ динамики численности индивидуальных клонов показал, что несмотря на то, что вторичный T-клеточный иммунный ответ гораздо слабее первичного, отдельные клонотипы отвечают на повторную вакцинацию так же сильно, как и на первичную, причем это характерно как для ревакцинации через 18 месяцев, так и для ревакцинации через 30 лет.

Впервые проведен одновременный мониторинг TCR α и TCR β репертуаров в различных временных точках после вакцинации, что позволило разработать оригинальный биоинформатический алгоритм для спаривания α - и β -цепей TCR на основе схожести клональных траекторий.

С помощью высокопроизводительного секвенирования TCR репертуаров различных подтипов T-клеток памяти в различных временных точках после вакцинации прослежено формирование иммунной памяти в ответ на вакцинацию. Впервые показано, что практически все разнообразие клонов, отвечающих на желтую лихорадку, сохраняется в виде иммунной памяти и доступно для ответа на повторный стимул. С помощью секвенирования транскриптомов единичных клеток, описаны два фенотипа T-клеток памяти, которые сохраняются в крови доноров через годы после иммунизации.

Впервые в организме человека показано, что ответ на единственный иммунодоминантный пепид LLWNGPMAV из белка NS4B вируса желтой лихорадки вируса может составлять более 60% всего цитотоксического Т-клеточного иммунного ответа. Охарактеризовано более 2000 α - и β -цепей TCR, специфичных к иммунодоминантному эпитопу. Среди клонотипов, реагирующих на иммунодоминантный эпитоп, найдены два больших и независимых кластера клонотипов, близких по структуре TCR внутри кластера, что указывает на два различных структурных решения, обеспечивающих связывание одного пептида.

Разработан оригинальный подход к поиску в TCR репертуарах клонов, активно участвующих в иммунном ответе, и показано, что разработанный алгоритм, может выявлять клоны, специфичные к вирусу желтой лихорадки в репертуаре, полученном на пике иммунного ответа на вакцинацию.

Теоретическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования состоит в подробном описании процесса формирования Т-клеточной памяти в различных временных точках после иммунизации эффективной живой вакциной. В частности, показано, что распределение и динамика фенотипов клеток памяти принципиально отличается для подтипов CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток. Различия эффекторных свойств и времени жизни охарактеризованных подтипов Т-клеточной памяти представляет собой интересную область для будущих исследований.

В работе представлены результаты секвенирования репертуара TCR субпопуляции Т-клеток, распознающих иммунодоминантный эпитоп вируса желтой лихорадки. Эти данные представляют большую ценность. Показано, что мотивы в последовательностях TCR, определяющие распознавание этого эпитопа, очень часто образуются в результате процесса рекомбинации генов Т-клеточного рецептора. Выдвинута гипотеза, что высокая частота наивных предшественников Т-клеток, распознающих этот эпитоп, является основным механизмом его иммунодоминантности.

Отдельно следует отметить использование в работе новейших методов транскриптомики индивидуальных клеток. Было показано, что спустя более года после иммунизации Т-клетки, распознающие один и тот же эпитоп, могут быть по-разному

распределены между функциональными подтипами Т-клеток памяти, и это распределение зависит от последовательности Т-клеточного рецептора.

Научно-практическая значимость

Научно-практическая значимость работы определяется разработкой целой группы новых экспериментальных методов и алгоритмов анализа данных, которые могут быть применены к анализу иммунного ответа на любую инфекцию и вакцинацию. Разработанная технология высокоточного и высокопроизводительного HLA-типирования может быть использована в клинической практике при подборе доноров для трансплантации органов или стволовых клеток. В работе также представлены три различных метода для идентификации клонов Т-клеток, вовлеченных в активный иммунный ответ. Все эти методы не зависят от природы и последовательности антигена, и поэтому могут быть применены в ситуации, когда конкретные антигены и иммунодоминантные эпитопы не известны, в частности, при изучении иммунного ответа на новые вирусные инфекции.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа написана по классическому плану, изложена на 112 страницах текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, благодарностей, списка использованной литературы, включающего 179 ссылок и двух приложений. Диссертационная работа содержит 40 рисунков и 2 таблицы.

Обзор литературы написан понятным научным языком и описывает аспекты формирования разнообразия TCR в ходе рекомбинации и последующей селекции, математические модели сборки TCR. Отдельная глава обзора посвящена классификации подходов к анализу данных секвенирования репертуаров TCR с примерами научных результатов, полученных с помощью этих подходов. Последняя часть описывает особенности строения вируса желтой лихорадки и формирование адаптивного иммунного ответа на вакцинацию аттенуированным вирусом желтой лихорадки.

В главе «Материалы и методы» подробно изложены современные методы, использованные автором во время работы, причем как экспериментальные методики, так и

биоинформатические подходы к анализу полученных данных. Глава «Результаты и обсуждение» имеет три раздела, где описана разработка оригинального подхода HLA-типирования, изменения в репертуаре Т-клеток доноров в ответ на иммунизацию против желтой лихорадки и разработка метода поиска клонов, активно-участвующих в иммунном ответе на основе первичной последовательности их TCR. В каждом разделе убедительно и лаконично описаны полученные результаты, а также дана их интерпретация в контексте современной иммунологии. Выводы работы обоснованы и вытекают непосредственно из полученных диссертантом данных.

Принципиальных недостатков в диссертационной работе А.А. Минервиной не выявлено. Работа вызывает одно главное пожелание – продолжать и развивать начатое, решать множество актуальных вопросов молекулярной и клеточной иммунологии, как фундаментальных, так и практически ориентированных, на основе тех технологий и подходов, научных заделов и результатов, которые автором созданы и использованы в данной диссертационной работе.

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на 6 международных конференциях. Основные положения диссертационного исследования изложены в 5 печатных работах, опубликованных в международных журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий, рекомендованных ВАК для опубликования результатов диссертации.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Заключение

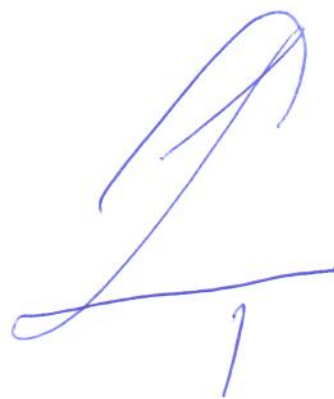
Диссертационная работа Минервиной Анастасии Алексеевны «Мониторинг адаптивного иммунного ответа человека при вакцинации против желтой лихорадки», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.01.03 – Молекулярная биология» представляет собой законченную научно-квалификационную работу высокого уровня. Полученные в ходе работы результаты вносят значительный вклад в решение актуальных проблем современной иммунологии. Так, на уровне отдельных клонов Т-клеток и структуры антиген-распознающих рецепторов этих

клеток охарактеризован процесс иммунного ответа на живую противовирусную вакцину и формирование долговременной памяти после вакцинации. Разработанные в ходе выполнения работы методики поиска антиген-специфических клонов Т-клеток могут будут использованы для исследования иммунных реакций на любые, в том числе, новые инфекции, а также при разработке новых эффективных вакцин. Диссертация Минервиной Анастасии Алексеевны полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а ее автор заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности «03.01.03 -Молекулярная биология».

Отзыв обсужден и утвержден на заседании лаборатории активации иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства России, протокол заседания № 12 от 08 апреля 2020 г.

Отзыв составил:

Атауллаханов Равшан Иноятович,
руководитель отдела иммунной биотехнологии,
заведующий лабораторией активации иммунитета
ФГБУ «ГНЦ «Институт иммунологии» ФМБА России,
доктор медицинских наук, профессор,
тел. +7 9035891732
e-mail: ravshan.ataullakhanov@gmail.com



Подпись *Атауллаханов Р.И.*
ЗАВЕРЯЮ
Учёный секретарь ФГБУ
«ГНЦ Институт иммунологии»
ФМБА России
Власов А.А.
"09" апреля 2020 г.

