

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01 НА БАЗЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ  
ИНСТИТУТА БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА И  
Ю.А. ОВЧИННИКОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК ПО ДИССЕРТАЦИИ НА  
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 08 октября 2014 г. № 9

О присуждении **Путинцевой Екатерине Викторовне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Разнообразие репертуаров Т-клеточных рецепторов человека и его изменения в ходе старения» по специальности 03.01.03 -молекулярная биология принята к защите 25.06.2014 г., протокол №8 диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10, Приказ Минобрнауки России от 15 февраля 2013 года №75/НК).

Соискатель Путинцева Екатерина Викторовна, 1989 года рождения.

В 2011 году соискатель окончила Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. С 2011 года по настоящее время обучается в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. В настоящее время (и в период подготовки диссертации) работает в должности старшего лаборанта с высшим профессиональным образованием в лаборатории геномики адаптивного иммунитета в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Диссертация выполнена в лаборатории геномики адаптивного иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель – доктор биологических наук Чудаков Дмитрий Михайлович, заведующий лабораторией геномики адаптивного иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

**Атауллаханов Равшан Иноятович**, доктор медицинских наук, руководитель отдела иммунной биотехнологии, заведующий лабораторией активации иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения "ГНЦ институт иммунологии" ФМБА России;

**Логачёва Мария Дмитриевна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории эволюционной геномики Факультета биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН), Москва, в своем положительном заключении, подписанном Ребриковым Денисом Владимировичем, доктором биологических наук, руководителем ЦКП "Генетический полиморфизм", указала, что работа проведена на высоком методическом уровне, является целостным и законченным фундаментальным исследованием и соответствует требованиям "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а Путинцева Екатерина Викторовна заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Соискатель имеет 9 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 7 работ объемом 3,1 печ. листов в зарубежных научных журналах, все 7 из которых включены в библиографическую базу Scopus, а 4 из них – в базу Web of Science. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации, в которые автор внес основной либо существенный вклад:

1. **Putintseva EV**, Britanova OV, Staroverov DB, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Shugay M, Bolotin DA, Pogorelyy MV, Mamedov IZ, Bobrynina V, Maschan M, Lebedev YB, Chudakov DM. Mother and child T cell receptor repertoires: deep profiling study. *Front Immunol.* 2013; 4:463.
2. Britanova OV\*, **Putintseva EV\***, Shugay M\*, Merzlyak EM, Turchaninova MA, Staroverov DB, Bolotin DA, Lukyanov S, Bogdanova EA, Mamedov IZ, Lebedev YB, Chudakov DM. Age-related decrease in TCR repertoire diversity measured with deep and normalized sequence profiling. *J Immunol.* 2014;192(6):2689-98. (\* - вклад в работу данных авторов равнозначен).
3. Shugay M, Bolotin DA, **Putintseva EV**, Pogorelyy MV, Mamedov IZ, Chudakov DM. Huge Overlap of Individual TCR Beta Repertoires. *Front Immunol.* 2013 Dec 25;4:466. doi:

4. Bolotin DA, Shugay M, Mamedov IZ, **Putintseva EV**, Turchaninova MA, Zvyagin IV, Britanova OV, Chudakov DM. MiTCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis. Nat Methods. 2013;10(9):813-4.

На диссертацию поступили отзывы:

1. **Отзыв официального оппонента д.мед.н. Атауллаханова Р.И;** отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1). Существует вероятность неравномерного распределения репертуаров Т-клеток между органами и кровью. Такую вероятность следует учитывать и, при возможности, исследовать, а в диссертации и публикациях отмечать, что представлены данные о репертуаре циркулирующего пула Т-клеток. 2). При сравнении репертуаров двух людей, наряду с относительным содержанием низкочастотных и высокочастотных клонотипов, было бы полезным сравнивать абсолютное количество клеток, представляющих клонотипы. 3). Были бы интересны данные о public последовательностях CDR3 и TCR $\beta$  в лимфоцитах пуповинной крови, что должно отражать разнообразие и совпадение секвенсов в отсутствии антигенных стимулов из внешнего мира. 4). Крайне интересным было бы дальнейшее изучение механизмов генерации идентичных последовательностей TCR у разных индивидов и определение антигенной специфичности таких public TCR. 5). 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.

2. **Отзыв официального оппонента к.б.н. Логачёвой М.Д.;** отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1). В первой части работы сравнительный анализ репертуаров генов бета-цепей Т-клеточных рецепторов пар мама-ребенок проводится без использования метода молекулярного баркодирования. 2). Амплификация фрагментов генов бета-цепей Т-клеточных рецепторов проводилась с использованием смеси полимераз Encyclo, которая, хотя и обладает корректирующей активностью, но не относится к высокоточным, что может служить дополнительным источником ошибок. Методический аспект работы сильно выиграл бы, если бы был проведен анализ репертуаров генов бета-цепей Т-клеточных рецепторов для одного и того же образца РНК с разными полимеразми. 3). Не очень понятно, как использование молекулярных баркодов помогает сравнению образцов с разным качеством РНК. Как уже упомянуто выше, оно позволяет минимизировать влияние артефактов, привнесенных в ходе ПЦР, а также определять абсолютное число молекул в

ходном образце – но коррекция эффектов, связанных с различиями в качестве РНК, на мой взгляд, находится за пределами возможности этого метода. 4). Также присутствуют некоторые неточности, опечатки и другие технические погрешности. В частности, вызывает вопросы постоянно встречающееся словосочетание “родственные и неродственные пары мама-ребенок”. Пара “мама-ребенок” – по определению родственная. 5). В подписи к рисунку 5.10 на странице 73 допущена ошибка – два раза повторено “правый столбец”, хотя очевидно, что одна из подписей относится к левому столбцу.

**3. Отзыв ведущей организации,** составленный д.б.н. Ребриковым Д.В. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1). В работе не приводится сравнительного анализа бета-цепей Т-клеточных рецепторов внутри группы мам и группы неродных детей. Полученные таким образом данные могли бы служить хорошим внутренним контролем. 2). Использование молекулярных баркодов в диссертационной работе по какой-то причине не сопровождается созданным в лаборатории и опубликованным новым эффективным алгоритмом коррекции ошибок MiGEC.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их достижениями и широкой известностью в иммунологической и молекулярно-биологической отраслях науки, наличием большого числа публикаций в высокоцитируемых российских и зарубежных журналах по тематике, соответствующей данной диссертационной работе. Их высокая квалификация позволяет объективно определить научную и практическую ценность диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований была разработана новая методика на основе молекулярного баркодирования, позволяющая корректно сравнивать репертуары Т-клеточных рецепторов разных образцов. Кроме того, впервые был проведен сравнительный анализ структуры репертуаров Т-клеточных рецепторов родственных и неродственных пар мама-ребенок. Впервые была показана степень влияния отбора в тимусе на формирование индивидуальных репертуаров Т-клеточных рецепторов человека и продемонстрирована динамика возрастных изменений, происходящих в репертуаре Т-клеточных рецепторов. Были выявлены ранее неизвестные параметры Т-клеточного иммунитета, предположительно связанные с долгожительством. Кроме того, получены уникальные данные о высокой степени пересечения репертуаров бета-цепей Т-клеточных рецепторов любых двух индивидуумов. Наконец, было впервые охарактеризовано более 10 000 наиболее часто встречающихся клонотипов в изучаемой популяции.

Теоретическая значимость диссертации состоит в том, что доказана значительность степени влияния селекции в тимусе на формирование индивидуальных репертуаров Т-клеточных рецепторов человека, раскрыты связи некоторых параметров Т-клеточного иммунитета и долгожительства, продемонстрирована огромная степень пересечения репертуаров Т-клеточных рецепторов любых двух индивидуумов и изучена природа явления общественных клонотипов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики обусловлено тем, что разработан метод корректного сравнения разнообразия Т-клеточных рецепторов независимо полученных образцов, а также представлены методические рекомендации по подготовке библиотек генов Т-клеточных рецепторов для высокопроизводительного секвенирования.

Оценка достоверности результатов исследований выявила, что работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, показана воспроизводимость результатов, а методы исследования, предложенные и использованные соискателем, прошли независимую экспериментальную проверку в некоторых других лабораториях, в том числе зарубежных. Экспериментальные результаты, полученные в данной работе, согласуются с другими литературными данными в соответствующей области исследований.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах научного процесса: в планировании и проведении экспериментов, в получении экспериментальных данных и их анализе. Основные экспериментальные данные получены соискателем лично за исключением HLA-типирования доноров, произведенного в Центре детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева. Подготовка основных публикаций по выполненной работе выполнялась лично или при непосредственном участии автора.

На заседании 08 октября 2014 года диссертационный совет принял решение присудить Путинцевой Екатерине Викторовне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 5 докторов наук по профилю диссертации (специальность 03.01.03 – молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовал: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Заместитель председателя  
диссертационного совета  
Ученый секретарь  
диссертационного совета



академик РАН Гришин Е.В.

доктор физ.-мат. наук Олейников В.А.