

## Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Егорова Евгения Станиславовича “Возрастные изменения в структуре репертуаров Т-клеточных рецепторов наивных Т-лимфоцитов”, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология – 03.01.03

Иммунная система является одним из ключевых компонентов живого организма. Благодаря своей возможности с высоким уровнем специфичности распознавать инфекционные и опухолевые агенты – она является ключевым фактором защиты живого организма от факторов среды. К сожалению, она так же подвержена процессам старения. Ключом к пониманию процессов старения может стать изучение популяции наивных Т-клеток, характеризующихся крайне разнообразным репертуаром Т-клеточных рецепторов. Данной проблеме как раз и посвящена работа Евгения Станиславовича.

Как мне кажется, кроме достаточно интересной биологической проблемы решаемой в ходе выполнения диссертационной работы, автором был предложен достаточно эффективный метод изучения репертуаров Т-клеточных рецепторов, основанный на UMI (уникальных молекулярных идентификаторов). Как известно основной проблемой современных методов высокопроизводительного секвенирования при изучении количественных характеристик изучаемого набора ДНК последовательностей является необходимость ПЦР амплификации исходного материала. Данная процедура вносит сильные искажения и не позволяет точно судить о частоте встречаемости той или иной нуклеотидной последовательности в образце. UMI как раз и призваны исправить данную ситуацию, а именно благодаря возможности идентифицировать каждую молекулу, которая подавалась на вход секвенатора, удаётся более точно количественно оценить встречаемость тех или иных последовательностей в изучаемых образцах.

Диссертационная работа Егорова Е.С. построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, раздела цели и задачи, раздела материалы и методы, результатов и их обсуждения, выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы. Диссертация изложена на 115 страницах и содержит 21 рисунок и 12 таблиц; список литературы содержит 183 источника. Материал диссертации изложен последовательно. Исследование проведено на высоком методологическом уровне, проделан большой объем работы. Надежность и достоверность полученных данных обеспечивается применением современных молекулярно-биологических и аналитических методов, а также разработанного лабораторией эффективного программного обеспечения.

Диссертационная работа носит полный и законченный характер – как в научном плане, так и в оформлении. Результаты диссертационной работы были опубликованы в одном отечественном и шести зарубежных научных журналах, а также доложены на 2 конференциях.

В обзоре литературы автор даёт необходимый объем информации о Т-клеточных рецепторах. Дается описание строения и организации Т-клеточных рецепторов, устройства генов Т-клеточных рецепторов и описывается процесс созревания Т-клеток и Т-клеточных рецепторов. На основе литературных данных Егоров Е.С. описывает известную на момент написания работы картину процессов, происходящих при старении иммунной системы. Описываются процессы старения тимуса, поддержания Т-клеточного пула на периферии. Автором дается описание Т-клеточного репертуара в старости, влияния CMV на Т-клеточный репертуар и функциональных изменений в старых Т-клетках. В разделе цели и задачи Егоров Е.С. формулирует поставленную перед выполнением диссертационной работы цель и указывает какие задачи были решены для их достижения. Раздел, посвященный материалам и методам содержит информацию о применяемых в ходе выполнения работы молекулярно-биологических методов и достаточно полно отражает спектр методов, использованных в работе.

Раздел результаты и их обсуждение состоит из трёх частей

В первой части автор даёт описание разработанного им метода анализа иммунных репертуаров на основе уникальных молекулярных идентификаторов. Автор описывает как молекулярно-биологическую часть разработанного метода, так и алгоритмические аспекты обработки данных, получаемых с его использованием. Наиболее интересной частью разработанного подхода является процедура коррекции UMI маркеров, реализованная в программе MIGEC. Так же автор приводит результаты трёх модельных экспериментов, использованных для тестирования разработанного метода анализа данных и сравнения с алгоритмом, реализованным в программе MiTCR, не использующем UMI. В первом модельном эксперименте были подготовлены и секвенированы кДНК библиотеки  $\alpha$  и  $\beta$  цепей Т-клеточных рецепторов, полученные из 8 равных реплик по 4000 РВМС (~2000 Т-клеток) одного взрослого здорового донора. На основе данных этого эксперимента автором было показано, что подход не учитывающий UMI приводит к переоценке разнообразия репертуаров TCR $\alpha$  и TCR $\beta$  библиотек. Благодаря учету UMI существенно улучшается количественная оценка клонотипов и генных сегментов. Частоты идентифицированных клонотипов лучше коррелировали при сравнении парных реплик при использовании уникальных молекулярных идентификаторов по сравнению со стандартным способом анализа данных. Во втором модельном эксперименте было

проведено тестирование алгоритма на возможность работы с небольшими клеточными популяциями. Для тестирования использовалась Сортированная субпопуляция TRBV9<sup>low</sup>, состоящая из 8 реплик по 500 Т-клеток. Так же был проведён дополнительный эксперимент на основе отсортированных CD8 Т-клеток памяти в репликах по 500 и 1000 клеток. Проведённые эксперименты показали успешность разработанной методики для работы с небольшими клеточными популяциями. Так же в этой главе автором демонстрируется эффективность работы разработанного метода при глубоком секвенировании иммунных репертуаров на основе кДНК библиотек β-цепей Т-клеточных рецепторов, полученных из двух здоровых доноров.

Во второй части работы автором было проведено изучение возрастных изменений в тотальных Т-клеточных репертуарах. Была показана высокая стабильность периферического Т-клеточного репертуара человека: значительная часть крупных клонотипов, занимающих не менее половины репертуара взрослого здорового донора, сохраняет свои частоты на протяжении как минимум трех лет. Так же в данном разделе приводятся результаты анализа с использованием разработанной методики тотальных TCRβ репертуары периферической крови доноров разного возраста (от 6 до 103 лет) и образцов пуповинной крови (UCB). В результате было установлено, что репертуары UCB отличаются большим количеством нефункциональных последовательностей CDR3 TCR, небольшим числом добавленных N нуклеотидов и высоким межиндивидуальным сходством; процент наивных CD4 и CD8 клеток практически линейно падает с возрастом и напрямую коррелирует с сокращением разнообразия репертуара ТКР. При этом популяция CD4 Т-клеток у самых пожилых доноров (со средним возрастом 92 года) характеризуется более высокой долей наивных клеток сравнению с CD8 популяцией; с возрастом уменьшается общее количество CMV и EBV специфичных клонотипов, при этом наблюдается увеличение среднего размера подобных клонотипов; возрастная группа долгожителей (средний возраст 92 года) по сравнению с группой пожилых доноров (средний возраст 60 лет) отличается меньшим количеством и размером CMV и EBV специфичных клонотипов, что вместе с относительно высокой долей наивных CD4 Т-клеток может указывать на наличие возрастного отбора.

В третьем разделе приводятся результаты анализа CDR3 TCRβ репертуаров наивных CD4 и CD8 клеток периферической крови для доноров двух возрастных групп. В результате автором было показано, что у пожилых доноров наблюдается рост клональных экспансий наивных CD4 и CD8 Т-клеток; репертуары наивных CD4 Т-клеток пожилых доноров характеризуются уменьшением длины CDR3 участка, размера NDN вставки и количества N нуклеотидов. Для CD8 клеток эти изменения не наблюдаются, либо носят

слабо выраженный характер; происходит изменение биофизических характеристик центральной части CDR3 региона у наивных CD4 Т-клеток, что в совокупности с изменением базовых характеристик может быть следствием периферической селекции наивного Т-клеточного репертуара с возрастом; с возрастом наблюдается рост публичности наивного CD4 репертуара, что может быть ассоциировано с преимущественной селекцией коротких вариантов CDR3 с меньшим количеством добавленных нуклеотидов; наблюдаемые изменения в пуле наивных CD4 Т-клеток затрагивают как субпопуляцию недавних эмигрантов из тимуса (RTE), так и зрелых наивных клеток, и не зависят от падения доли RTE с возрастом или изменения соотношения CD31+/CD31- клеток в целом.

Диссертационная работа не лишена ряда недостатков:

1. В тексте диссертации полностью отсутствует информация о том каким образом происходила первичная обработка данных секвенирования, а именно проводился ли какой-нибудь тримминг, удаление адаптерных последовательностей и т.д. и т.п.

2. В тексте диссертации проводится сравнение с программой MiTCR, которая проводит первичный биоинформатический анализ без учёта UMI. Очевидно, что читатель может ознакомиться в посвященной ей статье с её устройством, но для облегчения чтения текста хотелось бы чтобы автор дал небольшую характеристику применяемым там методам.

3. В литературном обзоре не уделяется должного внимания существующим методам биоинформатического анализа репертуаров Т-клеточных рецепторов, в связи с тем, что существенная часть работы посвящена разработке новой методики, как на молекулярно-биологическом уровне, так и на биоинформатическом, читателя следовало бы ввести в курс дела.

4. В работе показана зависимость разнообразия репертуаров Т-клеточных рецепторов от возраста индивида. Интересно было бы понять возможно решить обратную задачу, а именно на основе данных о разнообразии репертуаров Т-клеточных рецепторов установить возраст.

Эти замечания, однако, не снижают хорошего впечатления от работы и носят характер пожеланий или технических замечаний.

Диссертационная работа Егорова Евгения Станиславовича «Возрастные изменения в структуре репертуаров Т-клеточных рецепторов наивных Т-лимфоцитов» соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям. Диссертация полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней»,

утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842 (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., №1024 от 28.08.2017 г. и №1168 от 01.10.2018 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – “Молекулярная биология”.

7 февраля 2020 года

Официальный оппонент,

Старший научный сотрудник лаборатории №19

Института проблем передачи информации им.

А.А. Харкевича РАН,

кандидат физико-математических наук



А.С. Касьянов

*Артем Касьянов А.С.*  
*Заведующий*



*А.С. Касьянов*  
*10.02.2020*

Сведения об официальном оппоненте: Касьянов Артем Сергеевич, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории №19 Института проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН

Адрес: г. Москва, Большой Каретный переулок, д.19 стр. 1

Телефон: +79032062513

Электронный адрес: artem.kasianov@gmail.com