

Отзыв 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

Защита от вирусных инфекций, в частности, обеспечивается за счет функционирования адаптивной иммунной системы. В том случае, если механизмы врожденного иммунитета оказываются неспособны справиться с инфекцией, происходит клональная экспансия вирус-специфичных В- и Т-лимфоцитов, которая обеспечивает элиминацию возбудителя. После фазы контракции часть лимфоцитов переходят в клетки иммунной памяти, что обеспечивает длительную, а иногда и пожизненную защиту от повторной инфекции тем же штаммом возбудителя.

Адаптивная иммунная система принципиально способна распознать любого нового возбудителя. Это свойство основано на том, что в процессе созревания каждый лимфоцит формирует практически уникальный антиген-распознающий рецептор, а колоссальное разнообразие лимфоцитов с различными рецепторами совокупно перекрывает практически все возможные антигены. В частности, Т-лимфоциты проходят свое созревание в тимусе, где происходит отсев нефункциональных и аутореактивных рецепторов. После этого созревшие Т-лимфоциты выходя на периферию и циркулируют в виде наивных лимфоцитов, лишь малая часть из которых, встретив свой антиген, пройдет фазу клональной экспансии и в последствии сформирует иммунную память.

Современные экспериментальные подходы позволяют отслеживать судьбу отдельных клонов лимфоцитов за счет анализа больших массивов данных репертуаров последовательностей Т-клеточных рецепторов. Настоящая диссертационная работа

посвящена крайне актуальному вопросу о механизмах развития Т-клеточного иммунного ответа при первичной и вторичной встрече инфекцией. Для иммунизации была использована живая аттенуированная вакцина от желтой лихорадки, что позволяет моделировать острую вирусную инфекцию и реинфекцию. Ранее проводимые исследования Т-клеточного иммунного ответа на эту вакцину были сконцентрированы на изучении общей силы и динамики ответа. В настоящем исследовании впервые предпринята попытка охарактеризовать иммунный ответ на уровне отдельных клонов их принадлежности к различным фенотипическим субпопуляциям.

В этой работе автором была поставлена задача реконструировать репертуары альфа и бета цепей Т-клеточных рецепторов доноров в различных временных точках после вакцинации от желтой лихорадки и выявить клоны Т-лимфоцитов, специфичные к вирусу. Кроме того, сравнить силу и динамику Т-клеточного иммунного ответа на первичную и повторную иммунизацию и определить принадлежность клонов Т-лимфоцитов, распознающих вирус желтой лихорадки, к различным субпопуляциям клеток памяти. И, наконец, выявить характеристические мотивы в аминокислотных последовательностях Т-клеточных рецепторов, специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса желтой лихорадки.

Все поставленные задачи были с успехом решены диссертантом. Была проанализирована общая структура репертуара 2 доноров, один из которых был дважды вакцинирован (с промежутком в 18 мес.) в ходе выполнения исследования, второй был ревакцинирован. В различные временные точки до (для первого донора) и после вакцинации и ревакцинации у доноров отбирались пробы периферической крови, из которой выделялась как общая фракция периферических мононуклеаров, так и отдельные субпопуляции Т-лимфоцитов (CD4+, CD8+ клетки, клетки памяти, -лимфоциты, специфичные к иммунодоминантному эпитопу желтой лихорадки. Использование независимых реплик позволило повысить точность анализа, а



использование отдельных субпопуляций клеток памяти позволило сопоставить данные о фенотипе Т-лимфоцитов и последовательности их рецепторов.

В результате исследования были выявлены клоны, чья концентрация значимо и сильно увеличивалась после первичной вакцинации. Их число составляло около полутора тысяч, а на пике ответа их концентрация увеличивалась более, чем в 1000 раз и совокупно они занимали 7-8% всего репертуара. При этом наблюдалась также сильная контракция вирус-специфичной субпопуляции к 45 дню после иммунизации.

В то же время в ходе иммунного ответа на повторную иммунизацию доля клонов Т-лимфоцитов, специфичных к вирусу желтой лихорадки, в репертуаре возрастала всего в 2.5 раза, достигая лишь 0.5% от всего репертуара. При этом пик ответа наблюдался раньше (на 10 день, против 15 при первичной иммунизации). Число вирус-специфичных клонов при вторичном ответе так же было существенно ниже – около двухсот клонов. При этом общее количество Т-лимфоцитов в крови наивного и иммунизированного 30 лет назад донора не различалось.

Кроме того, за счет исследования последовательных временных точек была прослежена траектория отдельных клонов во времени и показано, что клоны существенно различаются между собой по тому, как их концентрации изменяются со временем. Также за счет анализа взаимной схожести траекторий изменения концентрации клонов в отдельно секвенированных библиотеках альфа и бета цепей Т-клеточного рецептора было произведено биоинформатическое спаривание альфа и бета цепей. Правильность предсказания для части клонов была независимо валидирована методом секвенирования единичных клеток.

Для того, чтобы в динамике проследить за формированием иммунной памяти были отсеквенированы репертуары Т-клеточного рецептора основных субпопуляций клеток памяти: центральная память, эффекторная память и терминально-дифференцированная эффекторная память. Было показано, что CD4 клоны периферической крови преимущественно представлены клетками эффекторная

памяти и центральной памяти, в то время как CD8 клоны имеют фенотип эффекторной памяти и терминально-дифференцированной эффекторной памяти.

Также в ходе работы была получена наиболее полная на сегодняшний день база данных последовательностей альфа и бета цепей Т-клеточных рецепторов, специфичных к иммунодоминантному эпитопу вируса желтой лихорадки (более 2 тыс. для каждой цепи). Был показан значительный перекоп в использовании эпитоп-специфичными клонами отдельных генетических сегментов (например, 45% клонов использует TRAV12-2, что в 10 раз чаще, чем в остальном репертуаре). Это свидетельствует о конвергентной рекомбинации рецептора. Любопытным фактом является то, что использование эпитоп-специфичными клонами V-генов альфа и бета цепей раскладывается на два четких решения.

Кроме того, в ходе работы был разработан метод HLA-типирования на основе РНК.

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

Обзор литературы написан лаконично, очень четко и хорошим научным языком и охватывает такие аспекты, как перестройка генетических фрагментов, кодирующих Т-клеточный рецептор, тимусная селекция, анализ репертуаров ТКР, в том числе изучения клональной динамики, адаптивный иммунный ответ на вакцинацию и ревакцинацию вирусом желтой лихорадки.

Раздел материалы и методы В разделе «Материалы и методы» подробно изложены использованные в работе методы. В разделе Результаты и обсуждение четко и убедительно описаны полученные экспериментальные данные и дана их интерпретация.



К незначительным замечаниям можно отнести:

1. Чрезмерное смелое обобщение о сравнительной силе CD4 и CD8 Т-клеточного ответа и возможная интерпретация полученных данных. Следует с большей осторожностью относиться к этим данным, так как они получены всего на одном доноре, получившем первичную иммунизацию. Мы в своих исследованиях вирусного ответа на SARS-CoV-2 наблюдаем существенную гетерогенность между донорами: у части доноров ответ CD4 превышает CD8, а у части, наоборот. Это может быть связано с различными наборами HLA аллелей, или с другими факторами.

2. Надежность метода спаривания альфа и бета цепей Т-клеточного рецептора через схожесть траектории изменения концентрации клонов следовало бы оценивать не через долю верно спаренных рецепторов из прочитанных методом секвенирования одиночных клеток, а наоборот, через долю верных предсказаний, верифицированных независимым методом.

Подводя итог, хочется сказать, что представленная работа выполнена на очень высоком уровне, сочетает в себе методы клеточной, молекулярной биологии и биоинформатики и представляет собой крайне удачно спланированное, выполненное и описанное исследование. Результаты, полученные в данной работе крайне важны для понимания динамики и механизмов развития иммунного ответа на вирусные инфекции. С высокой вероятностью эти результаты могут быть обобщены и на другие вирусы.

Исходя из вышесказанного, можно сказать, что диссертационная работа Минервиной Анастасии Алексеевны полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертационным работам, установленным "Положением 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),

и ее автор заслуживает присуждения степени кандидата наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент, заведующий  
лабораторией трансплантационной  
иммунологии ФГБУ «НМИЦ гематологии»

Минздрава России, к.б.н. Ефимов Григорий Александрович



ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России  
125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4  
Тел. +7 (495) 612-44-43  
e-mail: efimov.g@blood.ru

Подпись Ефимова Г.А. заверяю  
Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ гематологии»  
Минздрава России, к.м.н. Джулакян У.Л.



« 06 » мая 2020 г.