

Отзыв на диссертационную работу Мамедова Азада Энверовича
**«Молекулярный механизм взаимодействия фрагментов основного белка миелина
с главным комплексом гистосовместимости II класса человека»**

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности – 03.01.03 – молекулярная биология

Функционирование адаптивной иммунной системы находится под строгим контролем из-за потенциальной опасности распознавания здоровых тканей и их последующего повреждения. Одним из механизмов контроля является элиминация потенциально аутореактивных (то есть распознающих эпитопы, происходящие из собственных белков), клонов Т-лимфоцитов в процессе их созревания в тимусе.

Аутоиммунные заболевания, в частности, могут быть связаны с нарушением этого процесса и попадание на периферию клонов, распознающих собственные антигены. Косвенным подтверждением этого является статистически значимая корреляция носительства определенных аллелей главного комплекса гистосовместимости (МНС) с различными аутоиммунными заболеваниями. Рассеянный склероз (РС) – аутоиммунное нейродегенеративное заболевание, поражающее периферические нервные волокна, относится к числу таких болезней.

Описано, что CD4⁺ лимфоциты играют ключевую роль в патогенезе этого заболевания, что дополнительно подтверждается экспериментальными данными, полученными на модели этого заболевания на экспериментальных животных – ЕАЕ.

Неудивительно, что несколько аллелей МНС II положительно ассоциированы с развитием рассеянного склероза. Среди них HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*13 и HLA-DRB1*15. Любопытно, что также наблюдаются отрицательная ассоциации частоты заболеваемости РС с носительством некоторых аллелей МНС II. Так протективными являются HLA-DRB1*07 HLA-DRB1*09 и HLA-DRB1*14.

Показано, что основным аутоантигеном является основной белок миелина – МВР, описаны его пептиды, которые презентуются в аллелях главного комплекса гистосовместимости. Также охарактеризованы аутореактивные клоны Т-лимфоцитов.

Неизвестно, за счет чего обеспечивается протективная роль носительства определенных аллелей. Можно предположить, что это происходит за счет

неспособности этих аллелей эффективно презентировать пептиды, происходящие из MBP.

В данной работе была поставлена цель изучить презентации аутоантигенов аллелями II класса главного комплекса гистосовместимости, в частности аллелем HLA-DRB1*01:01, являющемся протективным и выявить возможные причины протективности.

В задачи этого исследования входило:

- Получение рекомбинантных белков главного комплекса гистосовместимости II и различных пептидов главного белка миелина
- Идентификация пептидов MBP и их эпитопов, презентующихся патогенным DRB1*15 и протективным аллелем DRB1*01
- Исследование термодинамических и кинетических параметров процесса презентации этих пептидов и сравнение с модельным вирусным пептидом
- Изучение презентации миелинового пептида на поверхности дендритных клеток, а также их способности активировать T-клеточный ответ.

В ходе работы были впервые идентифицированы два пептида MBP, связывающиеся с DRB1*01. Было показано, что скорость их загрузки в бороздку молекул главного комплекса гистосовместимости значительно уступает скорости загрузки модельного эпитопа, происходящего из гемагглютинина вируса гриппа. Что объясняет механизм протективного действия наличия аллеля DRB1*01:01.

В начале с использованием двух когорт: больных РС и здоровых людей, определявших себя как этнически русских авторы выделили две аллели MHC II положительно (DRB1*03 и DRB1*15), и две отрицательно (DRB1*01 и DRB1*11) ассоциированных с развитием РС. Эти данные согласуются с предыдущими исследованиями. В дальнейшей работе изучалось по одному аллельному варианту из каждой группы (DRB1*15 и DRB1*01).

Для изучения способности отдельных пептидов связываться с изучаемыми аллелями в линии клеток S2 *Drosophila melanogaster* были проэкспрессированы рекомбинантные молекулы HLA-DR в том числе с загруженным в бороздку пептидом CLIP, происходящим из инвариантной цепи MHC. Для ускорения замены инвариантного пептида на изучаемые эпитопы MBP были также получены рекомбинантные молекулы HLA-DM.

Ранее была получена библиотека фрагментов МВР, слитных с тиоредоксином. В этой работе также были созданы новые пептиды, слитные с тиоредоксином, в том числе происходящие из НА, рр65, CLIP и МВР с точечными мутациями, а также химерные пептиды.

В качестве контрольного пептида использовался иммунодоминантный пептид гемагглютинаина вируса гриппа НА306-318. Было показано, что аллель HLA-DRB1*01:01 способен связывать пептиды МВР81-104 и МВР146-170, а аллель HLA-DRB1*15:01 - только МВР81-104. Масс-спектрометрический анализ при этом не выявил пептидов, относящихся к МВР₁₄₆₋₁₇₀, связанных с HLA-DRB1*01:01, что указывает на то, что кроме константы взаимодействия существуют другие механизмы, регулирующие презентацию эпитопов, а протективность этого аллеля связана с его неспособностью презентировать пептиды, происходящие из МВР.

Методом аланинового скрининга были определены аминокислотные остатки, которые расположены в карманах на поверхности МНС и за счет этого определяют связывание с главным комплексом гистосовместимости.

Эксперименты по изучению аффинности взаимодействия пептидов и молекул главного комплекса гистосовместимости и кинетики их связывания показали, что HLA-DRB1*01:01 связывает как эпитопы, происходящие из МВР, так и вирусные пептиды с приблизительно одинаковой эффективностью, в то же время вирусный пептид НА вытеснял CLIP, предзагруженный на HLA-DRB1*01:01, в 4 раза быстрее по сравнению с миелиновыми пептидами МВР81-104 и МВР146-170, тогда как в аллель риска (HLA-DRB1*15:01) пептид МВР81-104 загружался со скоростью выше скорости взаимодействия HLA-DRB1*01:01 и НА.

С помощью конструирования гибридных пептидов, имеющих N-конец от одного пептида, а C-конец от другого было показано, что задержка связывания с аллелем HLA-DRB1*01:01 обусловлена C-концевой частью пептидов, происходящих из МВР.

Кроме того, была проведена проверка иммуногенности МВР₁₄₆₋₁₇₀. Для этого использовались периферические мононуклеары, чья пролиферативная активность оценивалась по снижению уровня окраски CFSE.

Диссертационная работа написана по классическому плану, изложена на 130 странице и состоит из актуальности проблемы, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, и списка использованной литературы, включающего 191 ссылку, и приложения. Работа содержит 36 рисунков и 13 таблиц.

Обзор литературы написан лаконично, очень четко и хорошим научным языком и охватывает такие аспекты, как структура МНС, презентация антигена и иммунологические аспекты патогенеза РС.

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. Особенное внимание хочется уделить прекрасно оформленным иллюстрациям, содержащим всю необходимую информацию.

К незначительным замечаниям можно отнести:

1. Отсутствие целей и задач в тексте диссертации. В автореферате, этот раздел также написан недостаточно четко. Очевидно, что сам автор хорошо представляет себе в чем заключается цель и задачи его исследование, но умение четко структурировать эту информацию и подать ее в понятной для читателя форме также является важным навыком, наряду с тщательной постановкой экспериментов.
2. Вызывает сомнение использованный подход для оценки иммуногенности пептидов, МВР представляемых протективным аллелем. Тот факт, что в краткосрочной экспансии не были детектированы клетки, специфичные к пептиду МВР146-170 может свидетельствовать как об отсутствии его презентации так и об эффективной отрицательной селекции специфичных Т-лимфоцитов в тимусе.

Подводя итог, хочется сказать, что представленная работа выполнена на очень высоком уровне, сочетает в себе методы молекулярной биологии и биохимии и представляет собой удачно выполненное и описанное исследование. Результаты, полученные в данной работе крайне важны для понимания механизмов развития аутоиммунного ответа.

Исходя из вышесказанного, можно сказать, что диссертационная работа Мамедова Азада Энверовича 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

125167, Москва, Новый Зыковский проезд, д. 4

Тел. +7 (495) 612-44-43

e-mail: efimov.g@blood.ru

25.05.2020

Подпись Ефимова Г.А. заверяю

Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России,

к.м.н. Джулакян У.Л.

