

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки
Института общей генетики
им. Н. И. Вавилова РАН,
чл.-корр. РАН, д.б.н., проф.



/Н.К.Янковский/

Отзыв ведущей организации

на диссертационную работу Путинцевой Екатерины Викторовны
“Разнообразие репертуаров Т-клеточных рецепторов человека и его
изменения в ходе старения”, представленную на соискание ученой
степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная
биология – 03.01.03.

Развитие методов секвенирования нового поколения (англ. next generation sequencing, NGS) внесло большой вклад в развитие современной науки и значительно повлияло на ее течение. Возможность одновременно получать информацию о вплоть до двух миллиардов прочтений последовательностей ДНК сделала NGS одной из ключевых технологий, в том числе, в области изучения адаптивного иммунитета.

Репертуары антител и Т-клеточных рецепторов индивидуума несут в себе потенциально читаемую информацию об иммунной

компетентности пациента, а также, вероятно, и о перенесенных и присутствующих в организме заболеваниях, аутоиммунных и онкологических состояниях. Подробное изучение их разнообразия без применения методов массированного секвенирования было бы невозможно.

В работе Е.В. Путинцевой метод NGS применяется для изучения таких аспектов Т-клеточного иммунитета, как индивидуальное разнообразие, наследственность, общественные клонотипы и старение. Полученные автором результаты вносят существенный вклад в фундаментальное понимание функционирования адаптивного иммунитета человека. Таким образом, научная новизна и актуальность работы не вызывает сомнений.

Диссертация Е.В. Путинцевой построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы. Материал диссертации изложен на 114 страницах и хорошо иллюстрирован. Во введении кратко сформулировано значение, актуальность, а также цели и задачи работы.

Обзор литературы составляют два больших раздела. Первый из них описывает Т-клеточный иммунитет человека. Второй посвящен существующим на сегодняшний день методам исследования репертуаров Т-клеточных рецепторов.

В первом разделе, в частности, затрагиваются такие важные для понимания работы темы, как генерация репертуара Т-клеточных рецепторов, механизм и структура взаимодействия Т-клеточного рецептора и молекулы комплекса гистосовместимости, приведены существующие оценки потенциального и реального разнообразия Т-клеточных рецепторов человека и мыши, обсуждено явление

общественных клонотипов и даны возможные объяснения этого явления, а также подробно описаны изменения, происходящие в Т-клеточном иммунитете человека в старости.

Во втором разделе кратко освещен спектр методов, использующихся для исследования репертуара Т-клеточных рецепторов, включающий в себя проточную цитометрию, спектротипирование, гибридизацию, а также секвенирование нового поколения. Автор кратко описывает 3 существующие платформы – Roche, Illumina и IonTorrent и затем подробно останавливается на способе секвенирования методом Solexa. Кроме того, автор приводит плюсы и минусы создания библиотек генов Т-клеточных рецепторов на основе геномной ДНК и кДНК. Наибольший интерес представляет раздел, посвященный коррекции ошибок (неизбежно накапливающихся как в процессе подготовки библиотеки генов, так и в ходе секвенирования) – то есть решению, пожалуй, наиболее актуальной проблемы, с которой сталкиваются исследователи, использующие метод секвенирования нового поколения.

Раздел “Материалы и методы” подробно описывает ход экспериментов, проведенных диссертантом, а также последующий анализ полученных массивов последовательностей. В частности, приведены прописи всех некоммерческих использованных растворов, последовательности использованных олигонуклеотидов, а также перечислены задействованные приборы. Таким образом, приведенные автором описания экспериментов достаточно полны для их воспроизведения.

Раздел, описывающий результаты, состоит из трех частей. В первой части автор изучает репертуары бета-цепей Т-клеточных рецепторов образцов периферической крови шести родственных пар

матерей и их детей. В рамках этого раздела автор проводит сравнение относительных частот использования семейств V-бета сегментов и репертуаров CDR3 в родственных и неродственных парах. Кроме того, автор предпринимает попытку обнаружения зрелых микрохимерных клонов в образцах периферической крови родственных доноров. Однако, чувствительность выбранного метода составила около 3,3% от количества изучаемых клонотипов и не позволила автору исключить возможность присутствия микрохимерных клонотипов в концентрации ниже чувствительности метода.

Наибольший интерес в первой части исследования представляет изучение перекрывания репертуаров бета-цепей Т-клеточных рецепторов любых двух индивидуумов. Автор произвел экстраполяцию полученных им данных по девяти изучаемым донорам на полный индивидуальный репертуар бета-цепей Т-клеточных рецепторов человека и впервые показал, что перекрытие аминокислотных репертуаров может составлять порядка 44% от общего индивидуального разнообразия. Эти наблюдения неожиданны и интересны для понимания функционирования адаптивной иммунной системы человека на популяционном уровне.

Во второй части результатов диссертант представляет новый метод нормализации независимо полученных библиотек генов с помощью введения так называемых молекулярных штрих-кодов (последовательность из нескольких случайных нуклеотидов), уникально метящих каждую входящую в анализ молекулу кДНК.

Этот элегантный метод позволяет адекватно сравнивать независимо полученные библиотеки генов с помощью нормализации каждой из них на количество входящих в анализ исходных молекул кДНК. Таким образом удается избежать влияния особенностей

приготовления каждой из библиотек на проведение сравнительного анализа их разнообразия. Помимо этого, метод теоретически позволяет эффективно и надежно избавляться от большого количества ошибок, возникающих в ходе генерации библиотек генов и в процессе секвенирования, путем сопоставления полученных последовательностей, меченых одним и тем же молекулярным штрих-кодом.

Разработанный метод далее применяется для анализа образцов крови 39 доноров разных возрастов в третьей части результатов. Автор ставит цель провести сравнительный анализ нормированного разнообразия репертуаров генов бета-цепей Т-клеточных рецепторов периферической крови для доноров различного возраста. В ходе работы было показано:

- постепенное падение индивидуального разнообразия Т-клеточных рецепторов с возрастом на фоне относительно стабильного общего количества Т-лимфоцитов;

- заполнение гомеостатического пространства пожилых людей активированными клонами Т-клеток и истощение наивных клонов;

- четкая корреляция количества наивных Т-лимфоцитов в образцах периферической крови доноров и наблюдаемого разнообразия Т-клеточных рецепторов;

- ассоциацию длительной продолжительности жизни с повышенным процентным содержанием наивных клеток в популяции CD4+ Т-лимфоцитов, повышенным содержанием низкочастотных клонотипов, а также относительно высоким разнообразием CDR3 бета-цепей Т-клеточных рецепторов.

Кроме того, на основании данных по наблюдаемому разнообразию последовательностей CDR3 бета-цепей Т-клеточных рецепторов в

расчете на 1 миллион Т-лимфоцитов была проведена оценка нижней границы общего разнообразия репертуара в периферической крови человека в зависимости от возраста и дана характеристика наиболее представленных общественных клонотипов.

Несмотря на многочисленные достоинства работы, она не лишена недочетов:

1. В работе не приводится сравнительного анализа репертуаров 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 MiGES.

Впрочем, названные недочеты не умаляют основных достоинств работы и не снижают общего положительного впечатления.

Все части исследования хорошо и полно изложены. Аналитическая часть работы занимательна, аккуратна и точна. Приведенные иллюстрации достаточно просты в понимании и хорошо иллюстрируют содержащуюся в тексте информацию. Работа проведена на высоком методическом уровне и является целостным и законченным фундаментальным исследованием.

Данные результаты были опубликованы в семи рецензируемых зарубежных научных журналах, доложены на международной конференции.

Автореферат полностью отражает основные результаты исследования.

Диссертационная работа Путинцевой Екатерины Викторовны «Разнообразие репертуаров Т-клеточных рецепторов человека и его изменения в ходе старения» соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» от 24.09.2013 №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре Центра коллективного пользования «Генетический полиморфизм» Отделения биологических наук Российской академии наук 26 августа 2014 года, протокол №1.

Руководитель ЦКП "Генетический полиморфизм" Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, доктор биологических наук

Д.В. Ребриков

Контактная информация:

Почтовый адрес: 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, д 3
8 (499) 135 62-13 E-mail: [iogen\(at\)vigg.ru](mailto:iogen@vigg.ru), www.vigg.ru

Подпись
удостоверяю

Ученый секретарь ИОГ
доктор биологических наук



Огаркова О.А.