

Отзыв официального оппонента

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

Функциональное и рецепторное разнообразие Т-лимфоцитов является залогом сбалансированной и эффективной иммунной защиты организма. Ключевой характеристикой Т-лимфоцита является его рецептор к антигену – Т-клеточный рецептор, способный распознавать молекулу антигена в составе комплекса гистосовместимости. То есть спектр антигенов, которые способны распознать Т-лимфоциты индивидуума, определяется репертуаром их Т-клеточных рецепторов. Чем выше их разнообразие, тем выше вероятность развития эффективной иммунной защиты против нового патогена. Таким образом, индивидуальный репертуар Т-клеточных рецепторов определяет диапазон распознаваемых антигенов и эффективность иммунной защиты.

До развития методов высокопроизводительного секвенирования (high throughput sequencing, HTS), изучение репертуаров Т-клеточных рецепторов было затруднено в связи с невозможностью получения информации о значительной доле репертуара. Однако методы HTS позволили вывести изучение адаптивного иммунитета на новый технический уровень. Применение этих методов для анализа репертуара Т-клеточных рецепторов на сегодняшний день является чрезвычайно актуальным и быстро развивающимся направлением.

Диссертационная работа Путинцевой Е.В. построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы. Диссертация изложена на 114 страницах и содержит 27 рисунков; список литературы содержит 153 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 семи зарубежных научных журналах, а также доложены на международной конференции.

Обзор литературы достаточно полно покрывает весь необходимый объем информации для понимания дальнейшего текста работы, а также адекватно отражает современное состояние изучения репертуаров Т-клеточных рецепторов человека. Задачи работы полностью соответствуют поставленной цели. Раздел, посвященный описанию материалов и методов исследования, содержит преимущественно молекулярно-биологические методы, а также методы статистического анализа полученных массивов последовательностей в ходе секвенирования. В целом, этот раздел достаточно полно отражает спектр использованных в работе методик. Результаты исследования полностью соответствуют поставленным в работе задачам и выводам.

Раздел результаты состоит из трех частей.

В первой части автор изучает степень наследуемости характеристик Т-клеточного иммунитета на образцах пар мама-ребенок. В частности, проводится анализ степени пересечения репертуаров CDR3 (как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей) родственных доноров для разных субпопуляций; сопоставляется частота встречаемости генов различных V β сегментов Т-клеточных рецепторов; предпринимается, правда на грани чувствительности метода, попытка обнаружения клонов зрелых микрохимерных Т-лимфоцитов в периферической крови родственных доноров.

Второй раздел посвящен созданию метода, позволяющего проводить сравнительный анализ независимо полученных библиотек генов методом HTS.

Суть метода заключается в мечении каждой стартовой молекулы кДНК в образце так называемым *молекулярным баркодом* - уникальным сочетанием нуклеотидов. Мечение баркодами позволяет идентифицировать, сколько и каких молекул присутствовало в образце на первой стадии пробоподготовки. Это дает возможность избежать искажений анализируемых библиотек молекул на различных этапах приготовления библиотек.

Молекулярное баркодирование также является мощным методом коррекции ошибок при анализе данных HTS, так как позволяет произвести кластеризацию прочтений по их молекулярной истории и с помощью множественного выравнивания идентифицировать ошибочно прочтенные нуклеотиды.

В работе Е.В. Путинцевой молекулярное баркодирование применено для анализа репертуаров Т-клеточных рецепторов. Это позволило автору, зная количество молекул кДНК на первом этапе приготовления библиотек, корректно нормировать репертуары Т-клеточных рецепторов, полученные из разных образцов, и таким образом сравнивать между собой репертуары разных доноров. Разработанная технология представляется

важной для проведения иммунологических исследований, а также потенциально применима и для других экспериментов, использующих HTS.

В третьем разделе изучается явление старения иммунной системы человека. В исследовании принимают участие 39 доноров разных возрастов. Объем анализируемых последовательностей соответствует миллиону уникальных Т-лимфоцитов каждого из доноров. В работе было показано, что разнообразие репертуара Т-клеточных рецепторов постепенно падает с возрастом, при этом происходит заполнение гомеостатического пространства активированными клонами. Помимо этого, была установлена связь между долгожительством доноров и повышенным содержанием наивных CD4+ клеток, а также относительно высоким разнообразием CDR3 β -цепей Т-клеточного рецептора.

Для четырех возрастных групп дана оценка нижней границы общего индивидуального разнообразия β -цепи Т-клеточного рецептора, а также показано, что увеличение глубины анализа вдвое повышает эту оценку (как минимум, в 1.7 раз).

В завершение работы был создан и охарактеризован список 10 000 самых распространенных общественных клонотипов изучаемой популяции (то есть встречаемых в периферической крови 15% анализируемых доноров). Было показано, что содержание таких клонотипов в крови падает с возрастом.

Хотелось бы отметить некоторые замечания, возникшие при прочтении текста диссертации.

1. Разработанный в ходе работы метод молекулярного баркодирования библиотек генов Т-клеточных рецепторов сильно облегчает процесс коррекции ошибок и позволяет произвести сравнительный анализ библиотек на намного более точном и корректном уровне. Однако в первой части работы сравнительный анализ репертуаров генов β -цепей Т-клеточных рецепторов пар мама-ребенок проводится без использования данного метода.
2. Обращает на себя внимание то, что амплификация фрагментов генов β -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 β -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 исходном образце – но коррекция эффектов, связанных с

различиями в качестве РНК, на мой взгляд, находится за пределами возможностей этого подхода.

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.

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.

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

Диссертационная работа Путинцевой Екатерины Викторовны «Разнообразие репертуаров Т-клеточных рецепторов человека и его изменения в ходе старения» соответствует требованиям, предъявляемым ВАК РФ к кандидатским диссертациям. Диссертация соответствует требованиям пп. 9,10,11,13,14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842) для ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент,

Ведущий научный сотрудник лаборатории

эволюционной геномики Факультета

биоинженерии и биоинформатики Московского

государственного университета им. М.В.

Ломоносова,

кандидат биологических наук

3 сентября 2014 года

Контактная информация:

Почтовый адрес: 119234, Москва, ГСП-1, Ленинские горы МГУ 1, стр. 73, Лаборатория эволюционной геномики

E-mail: maria.log@gmail.com



М.Д. Логачева

