

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Блиновой Варвары Глебовны на тему «Пролиферативная и супрессорная активность регуляторных Т-клеток человека с селективной экспрессией сплайс-вариантов FoxP3» по специальности 1.5.4. – Биохимия

Актуальность темы исследования.

Диссертационная работа Блиновой Варвары Глебовны посвящена крайне актуальной теме, которая непосредственно связана с проблемой иммунологической толерантности. Для защиты высших организмов и, в частности, человека, от инфекций, помимо мощных механизмов иммунного распознавания «свой-чужой» и продукции высокоаффинных антител, в ходе эволюции были сформированы толерогенные механизмы, защищающие от чрезмерной и неконтролируемой активации иммунитета и избыточной лимфопролиферации. Эти ингибиторные механизмы могут контролировать активацию Т- и В-клеток на уровне их созревания и селекции (центральная толерантность), на уровне самих клеток (иммунные контрольные точки), с помощью растворимых факторов (иммуносупрессорные цитокины) и, наконец, с помощью специализированных ингибиторных Т-клеток, которые получили название регуляторных Т-клеток (далее Трег). Они обладают уникальной транскрипционной программой, и, в отличие от нормальных (или конвенциональных) Т-клеток, при стимуляции через Т-клеточный рецептор активируют иммуносупрессорные механизмы, ингибирующие активацию других клеток иммунной системы. За образование этих CD4⁺ Трег отвечает уникальный фактор транскрипции семейства forkhead-box, сокращенно называемый FoxP3. Этот же белок отвечает за поддержание иммуносупрессорной программы, присущей этим клеткам, которые, помимо синтеза FoxP3 также характеризуются (у человека) высоким содержанием на поверхности альфа субъединицы рецептора IL-2 и отсутствием/низким уровнем маркера CD127 (альфа цепь рецептора IL-7). В норме Трег сдерживают избыточный ответ на патогены, защищая ткани от повреждения, а также ингибируют спонтанный аутоиммунитет, причиной которого является несовершенство тимусной селекции Т-клеток. Актуальность исследований молекулярных механизмов, определяющих функционирование Трег, сомнению не подлежит. Доказательством этого служат многочисленные клинические исследования, направленные на создание безопасных и

эффективных клеточных продуктов на основе Трег для лечения аутоиммунных заболеваний и обеспечения трансплантационной совместимости. В прошлом году за открытие механизмов иммунологической периферической толерантности и Трег Нобелевская премия по физиологии и медицине была присуждена японским и американским исследователям, что дополнительно подчеркивает важность Трег.

У человека ген, который кодирует белок FoxP3, может транскрибироваться с образованием нескольких транскриптов, которые отличаются по составу экзонов, и, соответственно, разные мРНК кодируют белки, отличающиеся по аминокислотной последовательности и, что логично предположить, могут иметь разные (и даже противоположные) функции. В данной работе была разработана методика переключения сплайсинга пре-мРНК FoxP3 с помощью ДНК-олигонуклеотидов, которая позволяет добиться продукции в клетках только одной мРНК, но не смеси из разных мРНК. В контексте Трег из донорской крови, которые с успехом научилась культивировать и размножать в культуре Варвара Глебовна, такое индуцированное переключение позволяет в фенотипических и функциональных тестах оценить супрессорную активность клеток, несущих отдельные изоформы- продукты трансляции определенных сплайс-вариантов FoxP3. Дополнительная значимость проведенной соискателем работы состоит в привязке данных по уровню экспрессии отдельных сплайс-вариантов FoxP3 к аутоиммунным заболеваниям. Показано, что у Трег из крови больных больше содержание сплайс-форм с делециями экзонов 2 и 7, в то время как у здоровых людей преимущественно встречается полноразмерный вариант. Предложен метод изменения соотношения между сплайс-формами, который, вероятно, позволит корректировать Трег больных с аутоиммунными заболеваниями, повышая их супрессорную активность за счет синтеза только полноразмерной изоформы.

Научная новизна результатов исследования.

Научная новизна работы состоит в систематическом изучении иммуносупрессорных свойств и иммунофенотипа Трег, в которых осуществлено переключение сплайсинга для продукции конкретной сплайс-формы. Для этого разработаны оригинальные методики, подобраны последовательности олигонуклеотидов-переключателей сплайсинга, отработаны методики размножения и функциональной характеристики Трег с определенными сплайс-вариантами FoxP3. Убедительно доказано, что делеция экзонов 2 и/или 7 существенно снижает иммуносупрессорную активность Трег, что хорошо коррелирует с увеличением содержания делеционных вариантов в Трег клетках крови пациентов с аутоиммунными заболеваниями. Впервые предложен подход для модуляции

иммуносупрессорной активности Трег с помощью направленного переключения сплайсинга.

Научно-практическая и теоретическая значимость.

Научная (фундаментальная) ценность работы заключается в систематическом изучении сплайс-вариантов FoxP3 человека и определении свойств отдельных изоформ в клетках крови. Полученные автором результаты существенно увеличивают наше понимание регуляции активности FoxP3 и контролируемой им иммуносупрессорной программы в контексте нормы или аутоиммунных патологий. Проведена работа (попытка) связать изменения в структуре FoxP3 при делеции некоторых экзонов из мРНК с транскрипционной активностью FoxP3, его способностью связывать ДНК и образовывать комплексы с белками-партнерами. Практическая значимость состоит в создании подходов для модуляции активности FoxP3 в донорских клетках на уровне сплайсинга пре-мРНК FoxP3, которые можно использовать для получения иммуносупрессорных клеточных продуктов на основе Трег с улучшенными супрессорными свойствами, в том числе, аллогенных. Полученные результаты могут быть в перспективе успешно транслированы в клинику.

Степень обоснованности и достоверности положений и выводов.

Достоверность положений и выводов диссертационной работы Блиновой В.Г. подтверждена публикациями в 6 высокорейтинговых рецензируемых изданиях, доложены на многочисленных конференциях. Эксперименты проведены в достаточном числе повторностей, успешно оценена статистическая достоверность наблюдаемых изменений. Несомненным является большой вклад автора в получении результатов и написании статей.

Структура и содержание работы.

Диссертационная работа Варвары Глебовны Блиновой изложена на 136 страницах, включает 11 таблиц, 50 рисунков и одно приложение. Текст диссертации содержит следующие разделы: Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы и Благодарности. Список цитированной литературы включает 172 источника.

В обзоре литературы подробно и достаточно лаконично представлены факты по биологии Трег, основные молекулярные механизмы, обеспечивающие образование, поддержание и функционирование Трег. Особое внимание уделено фактору транскрипции FoxP3, регуляции активности его гена на уровне транскрипции, а также активности самого

белка, в том числе за счет альтернативного сплайсинга. Я получил большое удовольствие от чтения данного раздела. Следует особо отметить хорошо структурированный и написанный грамотным научным языком текст, который отлично проиллюстрирован. Обзор литературы позволяет проникнуть в тему работы даже малоподготовленному читателю, плавно подводя читателя к целям и задачам настоящей работы.

Глава Материалы и методы содержит детальное описание методик, к которым прибегал автор в процессе выполнения работы. Внимание к мелочам и подробность изложения не вызывают сомнения в возможности воспроизведения экспериментов, осуществленных в соответствии с представленным набором методик.

Глава Результаты и обсуждение содержит основные результаты диссертационной работы и их обсуждение. Основные результаты представлены в списке положений, выносимых на защиту. Нет нужды перечислять отдельные результаты, но следует отметить, что для работы характерна четкая логика. Описания экспериментов и их результатов неизменно сопровождается гипотеза или вопрос, на который пытается найти ответ автор, при этом выбор конкретных методик строго аргументирован. Между отдельными частями раздела расположены связующие части, которые прекрасно демонстрируют глубокое понимание автором целей, смысла отдельных экспериментов и вероятных результатов. Глава хорошо иллюстрирована, качество рисунков и данных, подписи к ним позволяют понять, что именно и как было сделано. Результаты подробно обсуждены автором в следующем разделе, подчеркнуты ключевые результаты работы и значимость важных результатов.

Заключение обобщает результаты и подводит итоги проведенных исследований.

Наконец, раздел Выводы состоит из 5 основных выводов, которые полностью соответствуют результатам экспериментов, представленных в работе Варвары Глебовны Блиновой.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с требованиями и адекватно отражает содержание диссертации.

Замечания по диссертации.

В работе, безусловно, встречаются неудачные выражения, опечатки, ошибки в пунктуации, однако их немного, и они не портят общего хорошего впечатления от работы. Вместе с тем, после прочтения у меня возник ряд вопросов и замечаний:

- 1) На странице 7 использован термин «пре-матричная РНК», хотя принято пре-мРНК называть всё же предшественником матричной РНК;

- 2) На стр. 15 сказано: «Трег являются наивными до распознавания родственного им антигена». Перевод «родственный» в данном случае не совсем верен. Лучше использовать термин специфический антиген, что соответствует по смыслу;
- 3) В таблице 2 в качестве одного из маркеров указан белок Helios. Считать его маркером можно с большими оговорками, поскольку это внутриклеточный белок, который скорее относится к “signature gene”, то есть является характеристическим для определенной суб-популяции геном;
- 4) С удивлением обнаружил перечисление положений всех остатков пролина в N-концевом домене FoxP3. На мой взгляд, эта информация избыточна;
- 5) На стр. 38 автор пишет: «Использование модификаций сахарного компонента также позволяет добиться улучшения описанных недостатков.» Не совсем понятен смысл этого утверждения;
- 6) Вывод 2, на мой взгляд, скорее является констатацией полученного результата.

Данные комментарии, замечания и вопросы ни в коей мере не отменяют достоинств работы и выполнившего ее автора.

Заключение.

Диссертация Блиновой В.Г. представляет собой законченное научное исследование, которое имеет большую теоретическую, фундаментальную и практическую значимость. Эксперименты выполнены с помощью современных научных методов, а достоверность положений и выводов подтверждают 6 публикаций на тему работы в высокорейтинговых научных журналах. Результаты проведенных исследований существенно дополняют наше понимание механизмов функционирования регуляторных клеток и отдельных изоформ белка FoxP3. Полученные результаты могут помочь в создании новых клеточных препаратов для лечения аутоиммунных заболеваний человека и животных.

Считаю, что диссертация Блиновой Варвары Глебовны «Проллиферативная и супрессорная активность регуляторных T-клеток человека с селективной экспрессией сплайс-вариантов FoxP3» на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. - Биохимия, является законченной научно-квалификационной работой, обладающей новизной, теоретической и практической значимостью, и которую, в совокупности, можно квалифицировать как научное достижение в области биохимии.

По своей актуальности, объему выполненных исследований и научно-практической значимости полученных результатов диссертационная работа полностью соответствует требованиям п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (в редакции

с последующими изменениями), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор достоин присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. – Биохимия.

Руководитель лаборатории молекулярной вирусологии,
главный научный сотрудник
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН),
доктор биологических наук по специальностям
03.01.03 – Молекулярная биология
03.03.03. – Иммунология
Адрес: 117997, г. Москва, вн. тер.г. муниципальный округ Коньково,
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, к. 1
Тел.: +7(916) 303-43-09, e-mail: yrubtsov@gmail.com, yrubtsov@ibch.ru

Подпись Ю.П. Рубцова заверяю.
Ученый секретарь ГНЦ ИБХ РАН,
д-р физ. -мат. наук

04.02.2026 г.



Юрий Петрович Рубцов

Владимир Александрович
Олейников