

**ОТЗЫВ официального оппонента  
на диссертацию на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук Богомяковой Маргариты Евгеньевны  
на тему: «Иммуногенность дифференцированных производных  
плюрипотентных стволовых клеток человека»  
по специальности 3.2.7. Иммунология**

**Актуальность избранной темы**

Тема диссертационной работы Маргариты Евгеньевны Богомяковой связана с получением и анализом свойств производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Перспективность использования ИПСК в терапии признается в настоящее время во всем мире. Терапевтический потенциал этих клеток определяется в первую очередь их способностью дифференцироваться в различные клеточные типы и потенциальной возможностью получать специализированный клеточный продукт в неограниченном количестве. Немаловажным фактором является также допустимость получения ИПСК из соматических клеток. За счет своей клональности ИПСК подходят для геномного редактирования с последующим выбором безопасных и эффективных вариантов.

Биомедицинское применение производных ИПСК рассматривается и уже разрабатывается в мире для лечения таких распространенных заболеваний и патологий, как ишемический инсульт, нарушения кроветворения, нейродегенеративные заболевания, травмы спинного мозга, солидные опухоли, хотя для этого еще должен быть решен ряд юридических, этических и социальных проблем. Весьма привлекательной представляется возможность получения «универсальных» аллогенных клеточных продуктов на основе ИПСК, готовых к немедленному использованию. Одним из необходимых условий успешного применения таких клеток является отсутствие риска отторжения трансплантата и индукции иммунных реакций. Основная стратегия достижения этих условий сводится либо к удалению/подавлению поверхностной экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС), либо к внедрению генов

иммуносупрессорных молекул. Однако, снижение иммуногенности клеток уменьшает возможность их контролировать в случае опухолевого перерождения или инфицирования. В работе М.Е. Богомяковой исследуются иммуногенные свойства дифференцированных производных ИПСК человека, в том числе с нокаутом гена бета-2-микроглобулина (*B2M*), препятствующего экспрессии молекул МНС класса I (МНС-I), основных антигенов, вызывающих ответ аллогенных Т-лимфоцитов. Таким образом, избранная Маргаритой Евгеньевной тема несомненно актуальна, как с точки зрения фундаментальной науки, так и в практическом аспекте, связанном с разработкой терапевтических методов применения производных ИПСК.

#### **Степень обоснованности положений, выносимых на защиту, и научных выводов, сформулированных в диссертации**

Основным фокусом исследования М.Е. Богомяковой явился анализ способности дифференцированных производных ИПСК индуцировать реакции лимфоцитов как адаптивного ( $CD8^+$  Т-клетки), так и врожденного (NK-клетки) иммунитета. С помощью геномного редактирования CRISPR/Cas9 Маргаритой Евгеньевной проведен биаллельный нокаут *B2M* двух линий ИПСК, и получены дифференцированные фибробластоподобные производные этих линий. Возможность использовать аутологичные лимфоциты и соматические фибробласты обеспечила условия для сравнения иммунного ответа аллогенных и аутологичных иммунных клеток *in vitro*, что и было с успехом выполнено автором работы в двух полученных изогенных моделях. Низкая иммуногенность фибробластных производных ИПСК, не экспрессирующих на клеточной поверхности МНС-I (благодаря нокауту *B2M*), по отношению к аллогенным  $CD8^+$  Т-лимфоцитам была ожидаемо подтверждена. При этом, оба варианта производных ИПСК, с нокаутом и без, не вызывали существенного ответа аутологичных Т-лимфоцитов. В то же время, и дифференцированные производные ИПСК, и их варианты с инактивированным *B2M* индуцировали интенсивную дегрануляцию и цитотоксичность NK-клеток, включая аутологичные NK-клетки. Маргарите

Евгеньевне удалось продемонстрировать, что в основе данного эффекта лежит смещение в сторону активации баланса сигналов, получаемых НК-клетками за счет усиленной экспрессии ряда лигандов активирующих рецепторов NKG2D, DNAM-1 и NKp30, и сниженного уровня лигандов ингибирующих рецепторов НК-клеток (классических и неклассических HLA-I) в дифференцированных производных ИПСК. Более того, в работе убедительно показано, что изменение баланса сигналов может быть достигнуто без геномного редактирования ИПСК, путем обработки клеток IFN $\gamma$ , провоспалительным цитокином, продуцируемым самими НК-клетками в условиях активации. Представленные в диссертации результаты подтверждают сложность системы контроля активности НК-клеток, а также до конца не исследованную и, возможно, пока недооцененную роль микроокружения в активации НК-клеток в организме.

Можно заключить, что научные положения и выводы работы полностью обоснованы, логически вытекают из материалов проведенного исследования.

#### **Новизна исследования**

Новизна диссертационной работы прослеживается на нескольких уровнях: от постановки задач и создания изогенных моделей до сравнительного анализа иммуногенности аллогенных и аутологичных Т-лимфоцитов и НК-клеток и выявления способа коррекции иммунного ответа без генетической модификации ИПСК. С успехом использованная автором уникальная возможность провести сравнение иммуногенности исходных соматических клеток и дифференцированных производных ИПСК, в том числе с генетическим нокаутом *B2M*, в созданных изогенных моделях по отношению к аллогенным и аутологичным иммунным клеткам принесла целый ряд новых важных находок. Прежде всего, это демонстрация того факта, что дисбаланс лигандов активирующих и ингибирующих рецепторов НК-клеток может отличать дифференцированные производные ИПСК от исходных соматических клеток, что, в свою очередь, приводит к усилению

чувствительности этих производных к цитотоксическому действию аутологичных НК-клеток. Данные об активации аутологичных НК-клеток в ответ на производные ИПСК получены впервые. Интересно также, что сниженный за счет нокаута *B2M* уровень поверхностной экспрессии МНС-I не оказал решающего влияния на чувствительность анализируемых производных ИПСК к действию аллогенных НК-клеток, что дает новый взгляд на сложность проблемы повышенной реактивности НК-клеток в аллогенных реципиентах после трансплантации ИПСК. Весьма ценными представляются новые данные о влиянии длительного культивирования и пассирования, а также действия провоспалительного окружения (обработки IFN $\gamma$ ) на фенотип фибробластоподобных клеток.

Несомненно, результаты, полученные в диссертационной работе, будут полезны для разработки методов лечения, основанных на применении дифференцированных производных ИПСК. В то же время, большую ценность эти результаты имеют для прояснения фундаментальных аспектов иммунных реакций цитотоксических лимфоцитов адаптивного и врожденного иммунитета.

### **Степень достоверности результатов**

Широкий набор современных методов, использованный для решения задач исследования, в совокупности с достаточным количеством экспериментальных повторов и корректной статистической обработкой данных, обеспечил высокую степень достоверности полученных результатов. Основные результаты работы опубликованы в высокорейтинговых рецензируемых международных журналах *Stem Cell Research & Therapy* (IF 8.079), *Cells* (IF 7.666) и *Stem Cell Research* (IF 1.587), представлены и обсуждены на российских и международных конференциях. В российском журнале *Молекулярная биология* (IF 1.54) опубликована обзорная статья по теме диссертации. Все это также свидетельствует о качестве и научной ценности полученных результатов.

## **Структура диссертации**

Диссертационная работа изложена по стандартной схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания примененных в исследовании материалов и методов, результатов работы и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы. В работу также входит список сокращений и два приложения с дополнительными материалами по результатам секвенирования. Объем диссертационной работы составляет 120 страниц, содержит 5 таблиц и 37 рисунков. Библиографический список содержит ссылки на 247 литературных источников, из которых 4 отечественные.

Литературный обзор включает необходимую для восприятия работы информацию. Автор описывает имеющиеся данные об антигенах МНС, причинах и типах отторжения при трансплантации, о получении ИПСК и их дифференцированных производных. Особое внимание в разделе уделено известным к настоящему времени механизмам индукции иммунных реакций ИПСК и стратегиях преодоления проблемы иммуногенности этих клеток. Все перечисленные темы изложены последовательно и понятно, с достаточной степенью подробности, легко читаются.

Раздел «Материалы и методы» включает широкий спектр современных методов молекулярной биологии и клеточной иммунологии (30 пунктов). В частности, в диссертационной работе были применены методы, связанные с поддержанием, контролем и дифференцировкой культур ИПСК, с получением вариантов ИПСК с нокаутом  $\beta 2$ -микроглобулина с помощью геномного редактирования CRISPR/Cas9, включая трансфекцию, генотипирование, РНК-секвенирование, ПЦР в реальном времени, а также с выделением Т-лимфоцитов и НК-клеток периферической крови, их фенотипированием и анализом функциональной активности с помощью проточной цитофлуориметрии (активация, дегрануляция и цитотоксичность). Методы описаны очень подробно, что облегчает их воспроизведение. В

главе «Результаты и их обсуждение» приводятся и обсуждаются основные данные, полученные автором в экспериментах. В описании отражен фактический ход исследования, в последовательно изложенных отдельных частях экспериментальной работы прослеживается четкая логическая связь. В «Заключении» обобщены полученные результаты, проведена критическая оценка их значения для разработки методов терапии на основе дифференцированных производных ИПСК.

Принципиальных замечаний по работе нет. В то же время, имеются вопросы и мелкие замечания ознакомительного или рекомендательного характера.

1. Во введении предложение «Между тем, возможность активации НК-клеток в ответ на дифференцированные производные ИПСК ранее не рассматривалась» написано не очень корректно, поскольку реакция аллогенных НК-клеток на разнообразные производные ИПСК многократно изучалась. Хотя по контексту становится понятно, что по видимому имелась в виду активация именно аутологичных НК-клеток, тем не менее, целесообразно было бы это указать. Кроме того, можно было бы смягчить форму утверждения.
2. При описании участия рецепторов KIR в реакциях 'missing self' не упомянуты рецепторы KIR3DL1 (эпитоп Bw4) KIR3DL2 (HLA-A3, A11) (стр. 20). Отсутствие лигандов только для рецепторов KIR2DL1 или KIR2DL3 определяет реакцию missing self?
3. Название N-гликолилнейраминовой кислоты Neu5Gc два раза приведено с ошибкой (Neu5G) (стр. 35).
4. На стр. 47 указано, что «для супрессии KIR2D+ НК-клеток может быть использована эктопическая экспрессия HLA-G». В то же время, выше описано, что только рецептор KIR2DL4 из семейства KIR, а также рецепторы ILT2 и CD160 участвуют в распознавании HLA-G НК-клетками.

5. Найдено незначительное количество опечаток и мелких стилистических ошибок.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют научной значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 3.2.7. Иммунология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Богомякова Маргарита Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.2.7. Иммунология.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
лаборатории клеточных взаимодействий отдела иммунологии  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук (ИБХ РАН)

КОВАЛЕНКО Елена Ивановна

Контактные данные:

тел.: \_\_\_\_\_, e-mail:

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация:

14.00.36 Аллергология и иммунология

Адрес места работы:

117997, Российская Федерация, г. Москва,  
ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук (ИБХ РАН)  
Тел.: +7 (495) 335-01-00; e-mail: office@ibch.ru

Подпись сотрудника ИБХ РАН Е.И. Коваленко удостоверяю:  
Заместитель директора ИБХ РАН по науке

д.х.н.

И.В. Ямпольский