

ОТЗЫВ

официального оппонента Карпенко Л.И.

на диссертационную работу Тимошенко Валентины Викторовны

«Новые РНК-аптамеры и аптасенсоры для детекции аутоантител, характерных для рассеянного склероза», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия

Актуальность исследования

Аптамеры на основе нуклеиновых кислот представляют собой весьма обещающий класс высокоаффинных и специфичных лигандов для решения ряда задач современной медицины. Получают их путем направленного отбора из комбинаторных библиотек. Данная техника, как и другие методы комбинаторной биологии, дает возможность проводить скрининг гигантских репертуаров молекул аптамеров с помощью чрезвычайно быстрой и эффективной процедуры селекции. Аптамеры находят широкое применение в фундаментальных исследованиях молекулярных механизмов взаимодействия нуклеиновых кислот с различными лигандами, их начинают использовать для обнаружения повреждений в ДНК, для воздействия на экспрессию генов, а также в качестве модулей при конструировании рибозимов, обладающих аллостерическими свойствами. В настоящее время получены аптамеры как рибо-, так и дезоксирибонуклеотидной природы ко многим мишеням: белкам, пептидам, нуклеиновым кислотам, полисахаридам, малым органическим молекулам (аминокислотам, нуклеотидам и другим метаболитам), вирусным частицам, целым клеткам и даже тканям. По ряду своих характеристик аптамеры, функционально, схожи с моноклональными антителами и могут быть использованы, как в исследовательской работе, так и в создании средств терапии и диагностики заболеваний человека. На сегодняшний день создано огромное количество разнообразных методов селекции ДНК и РНК аптамеров к всевозможным мишеням для различных целей. Несмотря на кажущуюся лёгкость селекции аптамеров работа по их отбору весьма кропотлива и не проста, поскольку каждая биологическая мишень в зависимости от функционала, требует особого подхода к выбору целевого аптамера.

Особый интерес вызывает получение аптамеров к белкам-биомаркерам различных заболеваний и создание на их основе новых диагностических тест систем. Известно, что аутоантитела, характерные для аутоиммунных заболеваний, могут быть маркерами для ранней диагностики и мониторинга этого класса патологий. В настоящее время интенсивно исследуются роль аутоантител в патогенез аутоиммунных заболеваний для поиска рациональных схем их лечения. Несомненно, для этого необходимы хорошие

методы их определения у пациентов с подозрением на то или иное аутоиммунное заболевание. Однако выбор доступных на сегодняшний день методов лабораторной диагностики специфических аутоантител довольно ограничен. Одним из аутоиммунных заболеваний, для которых особенно остро стоит проблема разработки новых способов лабораторной диагностики, является рассеянный склероз (РС).

Это обуславливает высокую актуальность работы В.В. Тимошенко, направленной на создание модифицированных РНК-аптамеров к аутоантителам, характерным для рассеянного склероза, и созданию на их основе биосенсоров для детекции этих антител.

Научная новизна, достоверность и значимость результатов

Новизна работы определяется тем, что в ее рамках были получены два новых модифицированных РНК-аптамера к характерным для рассеянного склероза аутоантителам и проведена оптимизация их нуклеотидных последовательностей. Высокое сродство аптамеров к мишеням и селективность связывания позволили разработать на их основе новую систему сэндвич-типа с использованием фотопротеина обелина в качестве репортера для микропланшетной биолюминесцентной детекции аутоантител в пробах из сыворотки крови. Тестирование на выборке образцов сыворотки крови пациентов с РС и здоровых доноров показало, что созданный аптасенсор обеспечивает высокую чувствительность и специфичность детекции и представляет собой потенциальный инструмент для определения количества анти-ОБМ антител в сыворотке крови пациентов с РС. В дальнейшем созданная система может быть использована при установлении диагностической и прогностической значимости этого маркера, что указывает на высокую практическую значимость полученных результатов. Получение новых аптамеров к аутоантителам и демонстрация возможности их использования для создания биолюминесцентных аптасенсоров имеет большое фундаментальное значение.

Все основные результаты подтверждены современными физико-химическими методами. Методики экспериментов описаны в соответствующей главе диссертации. Выводы основаны на значительном экспериментальном материале.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа построена по традиционному образцу: состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 146 страницах, содержит 72 рисунка и 16 таблиц, библиография включает 174 литературных источника. В разделе «Введение» обоснована актуальность тематики работы, сформулированы цель и задачи работы,

показаны новизна и значимость исследования. Задачи соответствуют общей цели работы. Положения, выносимые на защиту, отражают суть работы и адекватны основным выводам. Обзор литературы посвящен получению аптамеров к антителам и их применению, с акцентом на создание оптических систем детекции. Обзор хорошо проиллюстрирован, содержит небольшое заключение, резюмирующее основные тенденции и перспективы в области разработки аптамеров и аптасенсоров к антителам.

Глава «Экспериментальная часть» содержит подробное описание материалов, приборов и методик экспериментов, проведенных в работе.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из подразделов, соответствующих последовательным этапам решения поставленных в работе задач. Первой частью работы было получение 2'-фтор-модифицированных РНК-аптамеров к характерным для РС аутоантителам из крови, узнающим основной белок миелина (ОБМ). Необходимо отметить, что в данной работе в качестве мишени для аптамеров выступала смесь анти-ОБМ антител, аффинно выделенных из сывороток нескольких пациентов с РС. Такой подход повышает вероятность получения аптамеров, направленных на общие для этих антител детерминанты. В результате сравнительного исследования сродства и селективности серии аптамеров был выбран наилучший вариант – аптамер **II-9**, для которого затем была проведена оптимизация нуклеотидной последовательности с целью удаления не участвующих в связывании с мишенью нуклеотидов. Оптимизация длины нуклеотидной последовательности аптамера **II-9** привела к получению его 57-звенного аналога – аптамера **II-9(57)**. Для получения аптамеров с повышенной селективностью была проведена дополнительная селекция, включающая в себя негативный отбор на антитела здоровых людей. Из полученной серии аптамеров был выбран аптамер **12-2**, для которого также была проведена оптимизация последовательности, и получен его 26-звенный аналог **12-2(26)** с сохранением свойств сродства и селективности. Было показано, что оба аптамера обладают способностью селективно узнавать характерные для РС анти-ОБМ антитела не только в аффинно очищенном препарате, но и в смеси суммарных антител из крови. Полученные в результате первого этапа работы 2'-фтор-РНК-аптамеры были затем использованы в качестве узнающих элементов при создании аптасенсорной системы детекции. Для этого в работе был выбран формат сэндвич-гибридизации на поверхности микропланшета с последующей оптической детекцией. Для получения аналитического сигнала в работе был выбран оптический метод детекции, а именно биоломинесцентная детекция. С этой целью в качестве репортерной группы был применен фотопrotein обелин, эта часть работы была выполнена совместно с красноярским Институтом

биофизики. Ранее данный белок хорошо зарекомендовал себя в различных видах молекулярного анализа. Следует отметить, что данная работа стала первым примером создания биолюминесцентных систем детекции на основе аптамеров и обелина. Было показано, что 57-звенный аптамер оптимален в качестве репортерного компонента аптасенсора, ковалентно связанного с фотопротеином, а 26-звенный аптамер – в качестве иммобилизованного на планшете улавливающего компонента. В работе были оптимизированы все основные стадии протокола анализа образцов биолюминесцентным аптасенсором. В частности, был разработан экспресс-протокол пробоподготовки образцов сыворотки. Завершающим этапом работы стала демонстрация возможности использования биолюминесцентного аптасенсора на основе пары аптамеров для анализа клинических образцов на примере большой выборки серологических образцов от больных РС и здоровых доноров. Было обнаружено, что использование созданного аптасенсора может с высокой долей вероятности исключить диагноз РС у пациентов с отрицательным значением сигнала, что может быть использовано при дифференциальной постановке диагноза. В перспективе разработанная система детекции может быть использована для определения уровня характерных для РС анти-ОБМ аутоантител при исследованиях диагностической и прогностической ценности этого маркера.

В разделе «Заключение» подведены итоги работы и обозначены ее дальнейшие перспективы. Основные выводы работы обоснованы и не вызывают сомнения.

Основное содержание диссертации полностью отражено в автореферате. Автореферат проиллюстрирован 12 рисунками и содержит 5 таблиц. По материалам работы опубликованы 3 статьи и 2 патента РФ.

Замечания

- 1) Обзор литературы носит местами избыточно подробный и описательный характер.
- 2) Не приведены хроматографические профили аффинной хроматографии при выделении анти-ОБМ антител из сыворотки крови.
- 3) На некоторых графиках (например, рис. 3.7, 3.19) не приведены значения разброса данных.
- 4) Остался невыясненным вопрос, связываются ли аптамеры П-9(57) и 12-2(26) с различными эпитопами антител-мишеней либо с одним и тем же эпитопом.
- 5) При тестировании созданного биолюминесцентного аптасенсора в качестве дополнительного контроля следовало бы включить выборку образцов от пациентов с другими аутоиммунными заболеваниями.

Заключение

Диссертационная работа Тимошенко В.В. представляет собой актуальное научное исследование, выполнена на высоком методическом уровне. Исследование четко спланировано и логически выстроено, вносит значительный вклад в решение вопросов биоорганической химии, связанных с созданием и использованием аффинных и специфичных биоузнающих лигандов на основе нуклеиновых кислот. Работа написана хорошим научным языком, тщательно оформлена.

Таким образом, по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Тимошенко В. В. отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к кандидатским диссертациям. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 02.00.10 биоорганическая химия (химические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1 – 2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложениям №5, 6 Положения о диссертационных советах, а ее автор Тимошенко Валентина Викторовна заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия».

Карпенко Лариса Ивановна
доктор биологических наук, специальность 03.01.03 – Молекулярная биология
Ведущий научный сотрудник ФБУН Государственный научный центр вирусологии
и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека

 Л.И. Карпенко

6306559, Новосибирская обл., п. Кольцово,
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
Тел.: +7(383) 3367400 доп.26-13
e-mail: karpenko@vector.nsc.ru

Подпись д.б.н., доцента Карпенко

Учёный секретарь
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
канд. биол. наук., доцент



 О.А. Плясунова