

Отзыв официального оппонента

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 – биоорганическая химия

Практическое применение РНК-аптамеров – перспективное направление современной молекулярной медицины как в области разработки новых диагностических систем, так и терапевтических схем лечения различных заболеваний. Аптамеры (искусственные антитела нуклеотидной природы) могут быть селективированы по отношению к разнообразным объектам. Сегодня показано, что аптамеры могут обладать уникальной избирательностью и высокими параметрами связывания с мишенью. Работа Тимошенко В.В. посвящена созданию новых РНК-аптамеров к аутоантителам, характерным для рассеянного склероза (РС) и разработке на их основе аптасенсоров. Одним из ключевых событий в патогенезе РС является развитие иммунопатологических реакций в центральной нервной системе. Важную роль играют реакции гуморального иммунитета с образованием антител к компонентам миелиновой оболочки. В настоящее время не до конца ясными остаются мишени антител, их вклад в развитие патологического процесса и этапы заболевания, на которых они имеют наибольшее значение. Расширение диагностического арсенала РС-характерных антител является важной задачей для изучения механизмов патогенеза РС, поэтому актуальность работы Тимошенко В.В. не вызывает сомнений.

Цель работы состояла в создании 2'-модифицированных РНК-аптамеров к анти-ОБМ аутоантителам, характерным для РС и конструирование на их основе аптасенсоров для детекции данных аутоантител в препаратах из сыворотки крови. Для ее реализации были поставлены следующие основные задачи.

- ✓ Получить РНК-аптамеры, способные специфично и с высоким сродством связываться с аутоантителами, исследовать их свойства.
- ✓ Исследовать возможность использования полученных аптамеров как молекулярных узнающих элементов при создании аптасенсоров.
- ✓ Оценить чувствительность и специфичность разработанного метода детекции на индивидуальных препаратах от пациентов с РС в сравнении с контрольной группы здоровых доноров.

Научная новизна работы состоит, в первую очередь, в создании новых аптамеров с

высокой аффинностью к анти-ОБМ аутоантителам, характерным для РС. Они были селективированы из библиотеки РНК, несущей в рандомизированной вставке 2'-F производные пиримидиновых нуклеотидов. Структура аптамеров была оптимизирована (минимизирована) стандартной процедурой удаления не существенных для связывания с мишенью фрагментов.

Продемонстрировано, что два аптамера способны связываться с антителами-мишенями и дискриминировать суммарные сывороточные антитела больных РС от антител здоровых доноров и больных системной красной волчанкой.

В диссертации впервые показана принципиальная возможность использования полученных аптамеров в качестве узнающих элементов аптасенсоров.

Предложена стратегия конструирования сенсора на основе пары аптамеров и фотопротеина обелина в качестве репортерной группы для получения биолюминесцентного сигнала.

Созданный новый аптасенсор протестирован на выборке индивидуальных образцов сывороток крови пациентов с РС и клинически здоровых доноров. Показано, что значения биолюминесцентного сигнала от образцов больных статистически достоверно выше по сравнению с контрольной группой.

Диссертация Тимошенко В.В. имеет традиционную структуру, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 146 страницах, содержит 72 рисунка и 16 таблиц. Библиография включает 174 литературных источника.

Обзор литературы «Аптамеры к антителам» изложен на 52 стр., свидетельствует о глубоком понимании автора тенденций в этой области исследования. К недостаткам обзора можно отнести его скорее описательный, а не аналитический характер. В заключении обзора подчеркнуты перспективы и достижения в области применения аптамеров к различным антителам, однако, не достаточно четко, на мой взгляд, аргументированы задачи настоящей работы, преимущества, например, 2'-F-РНК производных и системы детекции.

В экспериментальной части автор приводит сведения об используемых реактивах, приборах и основных методиках исследования. Раздел написан грамотно, хотя, в ряде случаев отсутствует информация о чистоте препаратов, например, белка обелина, полученных олигонуклеотидов, аптамеров и их конъюгатов. Не указана нагрузка белком ОБМ-сефарозы, что затрудняет оценку эффективности работы сорбента. Кроме того,

осталось неясным, для определения констант диссоциации аптамер-мишень использовался ли один и тот же препарат выделенных аутоантител или в каждом случае применяли свежесыведенные поликлональные аутоантитела от различных пациентов?

На первом этапе работы методом селекции из вырожденной РНК-библиотеки были получены 2'-F-РНК-аптамеры и проведено исследование их связывания с анти-ОБМ антителами из крови больных РС. Автор предполагает, что использование смеси поликлональных антител, полученных от разных больных РС, повышает вероятность получения «универсальных» аптамеров, способных узнавать антитела различных пациентов. Для поиска более эффективных аптамеров была осуществлена дополнительная *in vitro* селекция на анти-ОБМ аутоантитела с использованием ранее полученной обогащенной 2'-F-РНК-библиотеки RNA10. Негативная селекция к Ig здоровых доноров позволила сузить выборку специфичных ОБМ антител. Минимизация структуры наиболее аффинных аптамеров привела к получению двух перспективных последовательностей – 57 и 26 –мерных олигонуклеотидов. Аптамеры теоретически содержали характерные шпилечные структуры. К сожалению, в работе не были получены физико-химические характеристики стабильности вторичных структур аптамеров, что, на мой взгляд, является досадным упущением.

Важно отметить, что сравнительная оценка селективности связывания аптамеров П-9(57) и 12-2(26) с антителами-мишенями продемонстрировала их высокую избирательность в присутствии IgG из крови здоровых доноров и больных системной красной волчанкой.

Следующий этап исследования был посвящен созданию аптасенсоров для детекции анти-ОБМ аутоантител на основ 2'-F-РНК-аптамеров П-9(57) и 12-2(26). Для формирования аптасенсоров был выбран принцип образования комплексов сэндвич-типа на поверхности микропланшета с последующей оптической детекцией.

В первом варианте использовали иммобилизацию антител с последующим выявлением целевых мишеней конъюгатом аптамер-обелин и регистрацией сигнала после добавления Ca^{2+} . Интересно отметить, что эффективным оказался только конъюгат 57-мерного аптамера, в отличие от использования в качестве репортерного компонента конъюгата 12-2(26)-Обе. В диссертации высказана гипотеза о том, что в этом случае образованию комплекса с АТ стерически препятствует белковый домен конъюгата. Это предположение можно было бы проверить в экспериментах с флуоресцентно меченым аптамером 12-2.

Второй вариант разработанного аптасенсора сэндвич-типа содержал аптамеры как в

качестве улавливающего, так и в качестве репортерного компонентов. Реализация такого подхода возможна только при условии наличия разных сайтов связывания аптамеров с мишенью. Не смотря на то, что анализ процесса сорбции аптамеров в вариантах одновременного (или последовательного) связывания с целевыми антителами, к сожалению, остался за рамками исследования, успешная работа аптасенсора может косвенно подтвердить такое предположение.

После оптимизации протокола использования аптасенсора на основе пары 2'-F-РНК-аптамеров для анализа клинических образцов было проведено тестирование созданного биолюминесцентного аптасенсора на выборке индивидуальных препаратов сывороток крови от больных РС, здоровых доноров и пациентов с другими неврологическими патологиями. Чувствительность метода составила 63%, специфичность – 94.2% и позволяет достаточно надежно исключить диагноз РС у пациентов с отрицательным значением сигнала. Продемонстрировано, что применение данного аптасенсора может быть полезно для оценки уровня анти-ОБМ антител в крови пациентов с РС и установления диагностической и прогностической значимости этого маркера.

В целом, несмотря на замечания, сделанные выше, диссертационная работа Тимошенко В.В. производит впечатление зрелого и законченного научного исследования, выполненного на высоком уровне.

В качестве недостатка работы можно отметить отсутствие сопоставления параметров новых методов анализа с аналогичными или независимыми известными. Логично, например, было бы использовать для сравнения в качестве репортерного компонента системы синтетически доступные флуоресцентно меченые аптамеры, привести данные классического для диагностики РС иммуноблоттинга и др.

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».

Руководитель лаборатории искусственного антителогенеза
Федерального государственного бюджетного учреждения
"Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального Медико-биологического Агентства".

Доктор химических наук, профессор

Позмогова Галина Евгеньевна

Адрес: Россия, Москва, 119435, Малая Пироговская, д. 1а

Рабочий телефон: +74992424696

e-mail: pozmge@gmail.com

Подпись Позмоговой Г. Е. заверяю

Ученый секретарь ФНЦ ФХМ

к.б.н.



Кострюкова Е.С.