

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

ПОДЛЕСНЫХ СТЕПАНА ВАСИЛЬЕВИЧА

«Исследование репертуара циркулирующих антител и белок-белковых взаимодействий с использованием пептидных микрочипов»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Актуальность темы выполненной работы

Традиционные методы молекулярной биологии позволяют получить информацию об экспрессии, структуре и функции белков, однако, не могут обеспечить возможности массового параллельного анализа, необходимого для картирования всего протеома и профилирования репертуара циркулирующих антител.

Параллельный анализ с использованием микрочиповых систем оказался успешным в геномных исследованиях, однако создание белкового эквивалента микрочипов представляет собой более сложную задачу. Синтетические пептиды имеют значительные преимущества в применении к исследованию белок-белковых взаимодействий в экспериментах с микрочипами: простой синтез и модификация; возможность моделировать пептиды таким образом, что они смогут имитировать биологическую активность и структуру белков и обеспечивать прямой анализ различных белков; высокая стабильность.

Подлесных С.В. в своей работе использовал пептидные микрочипы для выявления изменений репертуара циркулирующих антител, как возможного инструмента ранней диагностики рака молочной железы, а также для поиска пептидов, взаимодействующих с молекулами контроля иммунитета, на примере рецептора CTLA-4, как потенциальных иммунотерапевтических агентов. Таким образом, объединение в данной работе двух концепций – детекции опухолей на ранних стадиях и стимулирования собственного иммунитета пациента – делает ее современной и крайне актуальной.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа Подлесных С.В. построена по традиционной схеме и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов исследований, Результатов и их обсуждения, Заключения, Выводов и Списка литературы. Работа изложена на 203 страницах, содержит 38 рисунков и 9 таблиц. Список цитируемой литературы включает 287 источников.

Во введении автор формулирует цели и задачи своей работы, обосновывает актуальность исследования, оценивает научную новизну и потенциальную практическую значимость результатов, формулирует положения, выносимые на защиту.

Глава 1, содержащая обзор литературы, посвящена рассмотрению особенностей развития и диагностики рака молочной железы. Особое внимание уделено циркулирующим маркерам «жидкой биопсии»: начиная от клеток и заканчивая белками, в том числе и циркулирующими антителами. Подробно рассмотрено применение пептидных микрочипов для исследования белок-белковых взаимодействий и поиска пептидов, способных блокировать взаимодействия молекулярных комплексов «лиганд – рецептор».

Глава 2, содержащая описание материалов и методов исследования, подробно описывает научно-методологические подходы, примененные автором для решения поставленных задач и достижения цели исследования. В исследовании используется широкий спектр методов химического синтеза и физико-химического анализа, молекулярной биологии, иммуногистохимии, молекулярного докинга и 3D-моделирования пептидов. Все методики, использованные в исследовании, детально прописаны и пояснены, что предоставляет возможность воспроизведения экспериментов по приведенным протоколам.

Глава 3 посвящена изучению репертуара циркулирующих антител у пациентов с различными молекулярными подтипами злокачественных новообразований молочной железы. В первой части главы представлены результаты исследования корреляции иммуносигнатур с молекулярными или клиническими характеристиками рака молочной железы. Во второй части данной главы описаны результаты исследования белок-белковых взаимодействий, на примере молекул контроля иммунитета (МКИ), а именно

пептидов, взаимодействующих с CTLA-4 молекулой, которая участвует в регуляции иммунного ответа.

Автором показано, что антитела плазмы крови пациентов с диагнозом рак молочной железы и здоровых доноров взаимодействуют с разными группами пептидов (мимотопов). Выявлено, что антитела плазмы крови пациентов с разными молекулярно-биологическими подтипами рака молочной железы, такие как люминальный А и Б, «тройной негативный» (базальный), взаимодействуют со специфическими панелями пептидов (мимотопов). Выявлены общие аминокислотные мотивы пептидов, взаимодействующих с циркулирующими антителами плазмы крови пациентов с РМЖ, что свидетельствует о наличии специфического иммунного ответа против антигенных эпитопов, связанных с молекулярными изменениями при развитии рака молочной железы. Показано, что синтетические пептиды, специфически взаимодействующие с белком-рецептором CTLA-4, способны блокировать его взаимодействие с природным лигандом В7-1.

Описанные результаты хорошо демонстрируют логику исследования и проиллюстрированы многочисленными рисунками и таблицами, которые облегчают восприятие материала.

Достоверность полученных результатов подтверждается статистической обработкой данных с использованием корректно подобранных критериев и тестов. Выводы основываются на фактически полученном автором материале и отражают суть проведенного экспериментального исследования. Автор выносит на защиту четыре научных положения, логично вытекающих из анализа результатов исследования. Обоснованность научных положений и выводов не вызывает сомнений. Материал, представленный в диссертации, получен и проанализирован автором исследования лично либо при его непосредственном участии.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

В настоящей работе впервые продемонстрирована возможность применения пептидных микрочипов высокой плотности для диагностики

онкологических заболеваний и поиска потенциальных соединений с иммуномодулирующими свойствами.

Впервые с помощью пептидных микрочипов был проведён сравнительный анализ репертуара антител (иммуносигнатур), циркулирующих в плазме крови человека в норме и при злокачественных новообразованиях молочной железы. Выявлены пептиды, которые показали статистически значимое отличие при реакции с антителами плазмы в образцах крови больных с диагнозом рак молочной железы (РМЖ) и здоровых доноров. Впервые выявлены и показаны особенности репертуара антител у пациентов с разными молекулярными подтипами РМЖ (I и II стадии) в зависимости от гормонально-рецепторного статуса заболевания. Таким образом, с помощью микрочипов впервые определены последовательности и структура пептидов (мимотопов), которые взаимодействуют с антителами плазмы крови и имеют потенциал практического применения при создании диагностических тест-систем.

Впервые с помощью пептидных микрочипов, содержащих массив из 330034 пептидов, состоящих из случайных последовательностей аминокислот, выявлены пептиды, специфически взаимодействующие с CTLA-4 молекулой, которая участвует в регуляции иммунитета. Показана способность одного из синтетических пептидов блокировать взаимодействие рецептора CTLA-4 с его природным лигандом В7-1.

Достоверность и обоснованность результатов исследований

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием широкого спектра современных биохимических и молекулярно-биологических методов исследований, детальным анализом полученных данных и корректными способами статистической обработки. Результаты работы представлены в 11 публикациях в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень ВАК, из них 6 статей в базах научного цитирования Scopus и Web of science, доложены и обсуждены на 16 российских и международных научных форумах и конференциях.

В работе можно отметить некоторое количество замечаний.

Так, раздел Материалы и Методы написан по типу раздела Результаты и обсуждение. Например, разделами «Дизайн эксперимента» и «Клинико-

морфологическая характеристика групп, отобранных для исследования» совершенно очевидно следовало бы начать раздел «Результаты и обсуждение», поскольку в них описываются объект и схема исследований.

Следует отметить решительную краткость описания некоторых разделов результатов. Так, практически не обсуждена Таблица 6 по гомологии выявленных пептидов с высоким сродством к антителам в крови больных с РМЖ с известными белками. Присутствует некоторое количество сленговых терминов, повторов и не удачных выражений, неправильных падежей, огромное количество запятых, расставленных не только согласно правилам пунктуации, а по вдохновению автора.

Тем не менее, сделанные замечания имеют дискуссионный характер, не снижают научной ценности полученных результатов и сделанных выводов и ни в коей мере не умаляют хорошего впечатления от работы.

При прочтении работы возникли следующие вопросы:

Согласно рисунку 27, раздел Результаты и обсуждение, автор дискриминирует пептиды с высокой и низкой аффинностью к антителам из крови пациентов с РМЖ. Наиболее встречаемые аминокислоты в пептидах с высокой аффинностью – это Gln, Glu, Ala, Leu, Pro, Gly, Val, то есть аминокислоты, содержащие в основном незаряженные группы, за исключением Gln и Glu. Тогда как в пептидах с низкой аффинностью присутствуют остатки аргинина и лизина, которые часто находят в связывающих центрах ферментов. Каково ваше возможное объяснение типа взаимодействия пептидов с высоким сродством к антителам с учетом наиболее часто встречаемых аминокислотных остатков?

Заключение


В целом, диссертационная работа Подлесных С.В. «Исследование репертуара циркулирующих антител и белок-белковых взаимодействий с использованием пептидных микрочипов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – *биохимия*, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение современной актуальной проблемы. По своей актуальности, научной новизне и практической значимости, набором методических подходов, объему выполненных исследований и

достоверности полученных результатов диссертационная работа Подлесных С.В. полностью соответствует паспорту специальности «Биохимия» и требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (в ред. Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 г. №723, от 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. №748, от 29.05.2017 г. №650, от 28.08.2017 г. №1024, от 01.10.2018 г. №1168), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Подлесных С.В. заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент,
Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).

Н.Л. Миронова

Адрес организации: Федеральное государственное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук
Адрес: 630090, Россия, г. Новосибирск, ул. Лавина, 8
www.niboch.nsc.ru, e-mail: mironova@ibfmc.nsc.ru


11.05.2024
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук
ул. Лавина, 8
Тел. 383-466-8424

Подпись д.б.н. Н.Л. Мироновой заверяю:


М.П. Е. Пестряков

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН,
Кандидат химических наук