

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Гуляевой Людмилы Федоровны на диссертационную работу Трегубчак Татьяны Владимировны «Свойства искусственных вариантов белка ортопоксвирусов, связывающего фактор некроза опухоли», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – молекулярная биология

Актуальность диссертационной работы

Фактор некроза опухоли (ФНО) является членом суперсемейства цитокинов TNF/TNFR, который играет важную роль в функционировании иммунной системы, воспалении и защитных реакциях организма против различных патогенов. Однако, как показали исследования, этот цитокин вовлечён в развитие патологических процессов, таких как аутоиммунные и злокачественные заболевания. С этой точки зрения ФНО можно рассматривать как мишень для терапии таких заболеваний. В диссертационной работе Трегубчак Т. В. исследуется возможность ингибирования этого цитокина при ревматоидном артрите, лечение которого на сегодня остается проблемой современной медицины. Для этого заболевания характерно хроническое воспаление, итогом которого является снижение качества жизни, а в некоторых случаях и инвалидизация пациентов. В связи с этим актуальной проблемой является создание препаратов, блокирующих этот фактор. Для этой цели в диссертационной работе предлагается использовать ФНО-связывающие белки ортопоксвирусов. В качестве ингибитора был выбран рекомбинантный ФНО-связывающий белок CrmB ВНО (cytokine response modifier В ВНО), который синтезируется в культуре клеток насекомых. Постановка данной научной цели является актуальным исследованием в современной молекулярной биологии, так как позволяет не только раскрыть некоторые свойства ФНО-связывающих белков ортопоксвирусов, но и исследовать их терапевтический потенциал для лечения ревматоидного артрита.

Научная значимость и новизна работы, на мой взгляд не вызывает сомнений. В работе впервые проведено детальное исследование структурно-функциональных особенностей белка CrmB ВНО и показано, что удаление хемокин-связывающего домена не меняет его способность ингибировать биологические эффекты ФНО. Также впервые показано, что TNF-BD с высокой аффинностью взаимодействует с ФНО, превосходя по данным показателям коммерческие анти-ФНО препараты. Получены оригинальные результаты, показавшие, что его укороченный вариант TNF-BD обладает сниженной иммуногенностью, что важно для его терапевтических свойств. Впервые получен белок TNF-BD ВНО, который обладает выраженными ФНО-нейтрализующими свойствами по сравнению с другими вариантами белка. Установлено, что пролин в 7-ой позиции N-концевого PLAD (preligand assembly domain)-субдомена белка необходим для проявления ФНО-нейтрализующей активности относительно ФНО человека. В работе также впервые показана возможность генотерапии ревматоидного артрита на модели коллаген-индуцированного артрита у крыс.

Несомненна и практическая значимость работы. Охарактеризованные варианты белка позволили выявить наиболее активные изоформы, обладающие высокой способностью связывать ФНО. Это открывает перспективы для получения лекарственных препаратов для лечения аутоиммунных заболеваний, в том числе ревматоидный артрит.

Достоверность представленных в работе результатов не вызывает сомнений, что подтверждается адекватным выбором штаммов бактерий, линий клеток и плазмид, а также набором современных молекулярно-биологических и биоинформатических методов. В работе использовано современное оборудование и широкий спектр взаимодополняющих методов, адекватных целям и задачам работы. Все полученные результаты обработаны с использованием современных методов статистического анализа. Достоверность результатов также подтверждена апробацией работы на

многих российских и международных конференциях. По теме исследования опубликовано 5 работ в журналах из перечня ВАК, имеется один патент на изобретение.

Характеристика диссертации

Диссертационная работа оформлена на 161 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: списка сокращений и условных обозначений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждений, выводов, списка литературы. В тексте диссертации содержится 37 рисунков и 17 таблиц. Список литературы состоит из 242 библиографических ссылок, из них 21 на русском языке, 221 – на английском языке.

Введение написано в соответствии с требованиями ВАК. В нем приводится актуальность проводимого исследования, где обосновывается важность исследования ФНО-связывающих вирусных белков. Далее ставится цель и задачи диссертационного исследования. Во введении также описывается научная новизна работы, теоретическая и практическая значимость с указанием разработанных подходов и методов исследования от дизайна олигонуклеотидных праймеров, моделирования белок-белковых взаимодействий до молекулярно-биологических методов. Во введении представлены положения, выносимые на защиту, список конференций, на которых были представлены результаты работы и информация о личном вкладе автора.

Глава 1 представляет собой обзор литературы, состоящий из нескольких разделов, посвященных современным представлениям о ФНО и его роли в развитии патологий человека. Отдельные главы посвящены лабораторным моделям патологий, обусловленных гиперпродукцией ФНО, препаратам, ингибирующим биологическую активность этого цитокина. В обзоре также описывается основной объект исследования – семейство ФНО-рецепторов ортопоксвирусов. В «Заключении» к обзору литературы автор

справедливо отмечает перспективность использования ингибиторов ФНО для терапии патологий человека, связанных с гиперпродукцией этого цитокина. Обзор хорошо иллюстрирован схемами и рисунками, что делает доступным понимание сути проблемы со сложными внутриклеточными коммуникациями.

В главе «Материалы и методы» автор достаточно детально описывает все используемые штаммы бактерий, линии клеток, плазмиды, расходные материалы. Далее описываются методы, такие как компьютерный анализ, современные молекулярно-генетические методы: трансформация компетентных клеток *E.coli*, секвенирование ДНК, трансфекция клеток Sf-21 вирусной ДНК, Вестерн-блот и др. Описание всех используемых методик сделано в соответствии с общепринятыми нормами.

Глава 3 «Результаты и их обсуждение» посвящена полученным результатам и их обсуждению в соответствии с их новизной и известными данными из научной литературы. В главе 3.1 проводилось определение иммуногенности белка CrmB ВНО относительно вирионного поксвирусного белка А30 ВНО.

В главе 3.2 проводилось конструирование рекомбинантных плазмид на основе вектора pFastBac1, содержащих гены, кодирующие рекомбинантные и делеционные варианты белка CrmB. Итогом проведенной работы было получение 6-ти рекомбинантных плазмид на основе вектора pFastBac1.

В главе 3.3 описано конструирование рекомбинантных бакуловирусов, содержащих гены, кодирующие рекомбинантные и делеционные варианты белка CrmB. Получено 6 рекомбинантных бакуловирусов и подтверждена первичная структура последовательностей, встроенных в вирусный геном.

В главе 3.4 проведен анализ продукции рекомбинантных и делеционных вариантов белка CrmB ортопоксвирусов в клетках насекомых Sf-21 с определением титра для каждого рекомбинантного бакуловируса. Установлены оптимальные условия культивирования клеток Sf-21, зараженных полученными рекомбинантными бакуловирусами, при которых достигается наибольший уровень продукции для всех полученных рекомбинантных белков.

Глава 3.5 посвящена исследованию биологической активности рекомбинантных и делеционных вариантов белка CrmB ортопоксвирусов *in vitro*. Был получен важный результат, показавший, что удаление ФНО-связывающего домена приводит к потере ингибирования цитотоксичности ФНО. При удалении PLAD-субдомена теряется способность нейтрализовать цитотоксическое действие человеческого ФНО. Был сделан вывод, что белок CrmB ВНО с делетированным SECRET-доменом, является более перспективным для создания терапевтических средств, нацеленных на патологии, связанные с гиперпродукцией ФНО.

В главе 3.6 приведено исследование ФНО-нейтрализующей биологической активности рекомбинантного белка TNF-BD ВНО в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Полученные результаты *in vitro* и *in vivo* для белка TNF-BD ВНО позволили автору рассматривать данный белок, как основу для создания анти-ФНО препаратов, несмотря на его гетерогенность.

В главе 3.7 представлены результаты по получению штамма *E.coli*, продуцирующего белок TNF-BD ВНО. Был получен продукт в препаративных количествах.

В главе 3.8 описываются результаты по изучению ФНО-нейтрализующей активности белка TNF-BD ВНО, полученного в прокариотической системе экспрессии, в экспериментах *in vitro*. Полученные данные позволили автору рассматривать негликозилированный белок TNF-

BD ВНО, полученный в бактериальной системе экспрессии, как возможную основу анти-ФНО-препаратов.

Глава 3.9 посвящена изучению иммуногенных свойств белка TNF-BD ВНО, полученного в прокариотической системе экспрессии. Результаты показали, что удаление SECRET-домена белка CrmB ВНО приводило к снижению гуморального иммунного ответа по сравнению с полноразмерным белком.

В главе 3.10 приводятся результаты исследования эффективности взаимодействия вирусных ФНО-рецепторов с соответствующим лигандом. Получены численные данные для комплексов TNF-BD ВОК / ФНО человека и TNF-BD ВНО / ФНО человека, которые согласуются с результатами моделирования молекулярной динамики комплексов. Также было показано, что удаление хемокин-связывающего домена белка CrmB не снижает эффективность взаимодействия белка с ФНО. Здесь также приведены данные SPR-анализа эффективности взаимодействия мутантных вариантов белка TNF-BD ВОК с ФНО человека и мыши.

Глава 3.11 посвящена исследованию терапевтического потенциала рекомбинантных молекул ДНК, содержащих ген, кодирующий TNF-BD ВНО. Результаты показали, что локальное введение рекомбинантных плазмид, направляющих синтез терапевтических белков, обуславливает гораздо меньший иммуногенный эффект по отношению к этим белкам по сравнению с инъекцией препаратов соответствующих рекомбинантных белков. В целом, результаты этой главы диссертации подтвердили потенциальную возможность генотерапии ревматоидного артрита при локальном введении рекомбинантной плазмиды, направляющей синтез TNF-BD ВНО.

Раздел заключение посвящен комплексному анализу всех полученных результатов и их обсуждению. Анализируя полученные результаты, автор делает заключение, что TNF-BD ВНО является перспективной основой для создания новых анти-ФНО препаратов.

Представленная диссертация написана хорошим научным языком, выполненные этапы исследования описаны логично. Рисунки полностью отражают полученные данные и позволяют не сомневаться в их достоверности. Выводы из проведенного исследования логичны и полностью соответствуют результатам.

Принципиальных замечаний к диссертационной работе у меня нет. При прочтении работы у меня появились вопросы дискуссионного характера:

1. Замечание к рис. 3.2. Вестерн-блот анализ белков А30 ВНО и CrmB ВНО. Не очень ясная картина с наличием белков-примесей. Для сравнения: на рис. 3.11 представлены яркие полосы белка.
2. На стр. 110 утверждается, что электрофоретический и Вестерн-блот анализы белковых препаратов показали наличие двух белковых продуктов ... (Рис. 3.8). Однако картина Вестерн-блота не приведена.
3. На стр. 120 автор утверждает, что удаление SECRET-домена белка CrmB ВНО привело к достоверному снижению гуморального иммунного ответа. Однако на рис. 3.15 не приведены результаты статистического анализа, как и на рис. 3.23. и 3.24.
4. Хотелось бы знать мнение автора, почему меняются иммуногенные свойства рекомбинантного белка CrmB ВНО в зависимости от системы экспрессии в про- или эукариотических клетках.

Заключение

Диссертационная работа Трегубчак Татьяны Владимировны «Свойства искусственных вариантов белка ортопоксвирусов, связывающего фактор некроза опухоли», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – молекулярная биология является законченной научной работой, в которой исследованы свойства различных вариантов рекомбинантного белка CrmB ВНО ортопоксвирусов,

связывающего фактор некроза опухоли, и показана возможность его использования как ингибитора этого цитокина. По актуальности, новизне, научной и практической значимости, а также методологическому и методическому уровню полученных результатов рассматриваемая диссертационная работа полностью соответствует критериям ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук согласно п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор Трегубчак Татьяна Владимировна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Гуляева Людмила Федоровна

Дата: «27» мая 2025г.

Подпись д.б.н., профессора Гуляевой Людмилы Федоровны

Заверяю:

Ученый секретарь ФГБНУ ФИЦ ФТМ

д.б.н.

Пальчикова Наталья Александровна

Дата: «27» мая 2025 г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» 630117, Россия, Новосибирская область, г. Новосибирск, улица Тимакова, 2. Телефон: +7 (383) 274-95-80. E-mail: director@frcftm.ru. Сайт: www.frcftm.ru.

Личную подпись Гуляевой Л.Ф. заверяю
Пальчикова Н.А.
отдела кадров ФИЦ ФТМ
«27» мая 2025 г. подпись Пальчикова