

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию Боробовой Елены Александровны «Разработка и изучение свойств искусственных полиэпитопных антигенов меланомы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертационная работа Боробовой Елены Александровны посвящена созданию и наработке плазмидных ДНК, экспрессирующих антигены меланомы в клетках человека, а также анализу противоопухолевого иммунного ответа клеток, трансфицированных этими плазмидными ДНК в системе *ex vivo*.

Актуальность темы диссертационной работы обусловлена в первую очередь разработкой принципиально нового подхода к созданию средств терапии онкологических заболеваний на основе полиэпитопных ДНК-вакцин. В настоящее время конструирование полиэпитопных ДНК-вакцин рассматривают в качестве перспективной стратегии формирования как гуморального, так и клеточного иммунного ответа для терапии инфекционных и онкологических заболеваний.

Меланома кожи является одним из самых быстро прогрессирующих заболеваний с высокой смертностью пациентов. Мировой среднегодовой темп прироста заболеваемости меланомой кожи занимает второе место после рака легкого. Поэтому, результаты работы по созданию и исследованию свойств полиэпитопных антигенов меланомы, представленные в диссертационной работе Боробовой Е.А., важны как для понимания механизмов формирования противоопухолевого иммунного ответа, так и для разработки новых, современных методов диагностики, профилактики и терапии социально-значимых заболеваний.

Основные научные результаты диссертационной работы Боробовой Е.А. связаны с созданием плазмидных ДНК, экспрессирующих множественные цитотоксические и хелперные эпитопы антигенов клеток меланомы, и направлены на изучение способности разработанных конструкций индуцировать противоопухолевый иммунный ответ в системе *ex vivo*.

Для создания ДНК-вакцин, экспрессирующих эпитопы клеток меланомы, в работе использовано уникальное программное обеспечение – программы TEpredict и PolyCTLDesigner. Проведена разработка двух искусственных полиэпитопных иммуногенов MEL-TCI и MEL-A0201. При этом, иммуноген MEL-TCI был составлен с учетом процессинга до пептидов, рестриктированных различными аллельными вариантами молекул главного комплекса гистосовместимости HLA I, а иммуноген MEL-A0201, содержал эпитопы, рестриктированные только одним алломорфом HLA-A*02:01.

Боробовой Е.А. проведено конструирование плазмидных векторов, экспрессирующих в клетках человека полиэпитопные иммуногены MEL-A0201, MEL-TCI, а также контрольного плазмидного вектора, экспрессирующего рекомбинантный аналог антигена меланомы, узнаваемый Т-клетками – MART-1.

Проведена работа по анализу экспрессии антигенов MEL-A0201, MEL-TCI и MART-1 в культуре фибробластов человека линии HEK293T, трансфицированных сконструированными в работе плазмидными векторами. Установлено, что трансфекция клеток HEK293T векторами pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1 сопровождается синтезом РНК-продуктов, детектируемых методом ОТ-ПЦР с праймерами, специфичными к РНК/кДНК A0201, TCI и MART-1.

Методом вестерн-блота с моноклональными антителами 29F2 к общему для MEL-A0201, MEL-TCI и MART-1 маркерному эпитопу TBI установлено, что трансфекция клеток HEK293T сконструированными в работе плазмидными векторами сопровождается продукцией целевых рекомбинантных белков.

Методом иммунохимического окрашивания *in situ* с антителами 29F2/30A6 к маркерному эпитопу рекомбинантных белков установлено, что в клетках HEK293T, трансфицированных векторами pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1, детектируются белки с индикаторным маркерным эпитопом.

Для анализа способности ДНК-вакцин индуцировать противоопухолевый иммунный ответ к клеткам меланомы человека линии Mel Is, экспрессирующих белки главного комплекса гистосовместимости аллельной группы A*02, была подобрана группа здоровых доноров с HLA-A*02. Проведена работа по выделению моноклеарных клеток из периферической крови доноров и созданию культур зрелых дендритных клеток. Приведены данные анализа культур дендритных клеток человека методом проточной цитофлуориметрии, которые позволяют заключить, что полученные культуры содержат субпопуляции, несущие маркеры миелоидных клеток – CD80, CD86, CD11c и CD83.

В совместной культуре дендритных клеток, трансфицированных вектором pMEL-TCI, и моноклеарных клеток периферической крови доноров, стимулированных синтетическими пептидами меланомы, выявлено повышение вклада CD8⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих гранзим В – один из основных цитотоксических факторов Т-лимфоцитов.

Боробовой Е.А. проведен анализ цитотоксического действия моноклеарных клеток периферической крови, активированных дендритными клетками, трансфицированными векторами pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1, на клетки меланомы человека линии Mel Is. Для этого был использован метод колориметрического

анализа активности цитоплазматической лактат-дегидрогеназы в культуральной среде – индикатора лизиса клеток-мишеней. Установлено, что цитотоксический ответ, индуцированный разработанными ДНК-конструкциями pMEL-A0201 и pMEL-TCI, достоверно превышает ответ, индуцированный контрольной плазмидой pcDNA-MART-1 в той же клеточной системе.

Результаты диссертационной работы Боробовой Е.А. подтверждены экспериментальными данными в сочетании с анализом данных литературы. Результаты представлены на всероссийских и международных конференциях и опубликовано 11 тезисов. По материалам диссертации опубликованы 4 статьи, из них 3 в журналах, рекомендованных ВАК. Боробова Е.А. является соавтором 2 патентов на изобретения.

В целом, достоверность, новизна, научная и практическая ценность результатов диссертационной работы не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Боробовой Елены Александровны изложена на 132 страницах и содержит следующие разделы: “Список сокращений”, “Введение”; “Обзор литературы”; “Материалы и методы”; “Результаты и обсуждения”; “Заключение”; “Выводы”; “Список литературы” (191 источник); “Благодарности” и “Приложения”. Работа включает 16 рисунков, 4 таблицы и 3 приложения.

В разделе **Введение** представлено обоснование актуальности создания нового поколения ДНК-вакцин, кодирующих полиэпитопные иммуногены, обеспечивающие Т-клеточный ответ к клеткам злокачественных опухолей, в частности к клеткам злокачественной меланомы кожи, с использованием подхода, учитывающего процессинг и презентацию антигенов в клетках человека.

Корректно и однозначно сформулированы цель и задачи исследования. Обозначена теоретическая и практическая значимость работы и её научная новизна. Представлены необходимые сведения в подразделах: “Основные положения, выносимые на защиту”; “Апробация работы и публикации”; “Структура и объем диссертации” и “Личный вклад автора”.

В разделе **Обзор литературы** представлены современные данные о клеточных и молекулярно-биологических процессах иммунного ответа на антигены злокачественных опухолей. В обзоре представлены данные о процессах, приводящих к иммуносупрессии, и о процессах формирования иммунотолерантности, которые способствуют пролиферации и метастазированию раковых клеток. Важной частью “Обзора литературы”, которая раскрывает актуальность экспериментальных данных диссертационной работы, является подраздел “Вакцины на основе дендритных клеток”. Подраздел обобщает методы и подходы к созданию средств иммунотерапии онкологических заболеваний, включая

разработку ДНК-вакцин, направленных на формирование Т-клеточного ответа к клеткам злокачественных опухолей.

Обзор литературы составлен с использованием актуальных источников, иллюстрирован, логично организован и легко читается.

В главе **Материалы и методы** представлен освоенный автором набор молекулярно-биологических и цитологических методов, который включает: амплификацию ДНК; гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции; лигирование ДНК; клонирования ДНК в клетках *E.coli*; выделение плазмидной ДНК из клеток *E.coli*; трансфекцию клеток человека плазмидными ДНК; выделение РНК из лизатов клеток эукариот; электрофоретическое разделение ДНК в агарозном геле; электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле с последующим вестерн-блот-анализом; иммунохимическая окраска клеток и другие.

В главе **Результаты исследования** представлено описание процесса конструирования (дизайна) полиэпитопных ДНК-конструкций с использованием программ PolyCTLDesigner и TEpredict. С использованием этих программ были спроектированы два полиэпитопных антигена, описанные в работе как ««Аллелеспецифический» иммуноген, содержащий эпитопы, рестриктированные аллельным вариантом молекулы HLA-A*02:01, и «универсальный» полиэпитопный иммуноген, содержащий эпитопы, рестриктированные 12 мажорными аллельными вариантами молекул HLA I класса».

В разделе “3.2. Создание рекомбинантных плазмид, кодирующих полиэпитопные иммуногены MEL-A0201 и MEL-TCI” Бороховой Е.А. представлено описание процесса конструирования плазмид, кодирующих полиэпитопные иммуногены MEL-A0201 и MEL-TCI”. Выходы биотехнологического процесса и общие характеристики ДНК-продуктов обозначены в разделе “3.3. Нарботка препаративного количества ДНК рекомбинантных плазмид”.

В разделе “3.4. Изучение экспрессии полиэпитопных генов в клетках эукариот, трансфицированных плазмидами pMEL-TCI, pMEL-A0201 и pcDNA-MART-1” приведены ключевые экспериментальные данные, определяющие значимость диссертационной работы.

Установлено, что трансфекция клеток HEK293T векторами pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1 сопровождается синтезом соответствующих мРНК и белков.

С использованием мононуклеаров периферической крови человека в системе *ex vivo* установлено, что ДНК-конструкции pMEL-A0201, pMEL-TCI и pcDNA-MART-1,

экспрессирующиеся в дендритных клетках, обеспечивают индукцию противоопухолевого иммунного ответа при взаимодействии дендритных клеток с CD8⁺ Т-лимфоцитами,.

Замечания:

1. В работе не представлены данные о структуре рекомбинантного аналога контрольного антигена меланомы, кодируемого плазмидой pcDNA-MART-1. В частности, не указано, что рекомбинантный белок содержит эпитоп для моноклональных антител 29F2 или 29F2/30A6. Отсутствие данных о структуре pcDNA-MART-1 и о рекомбинантном белке затрудняет анализ и интерпретацию данных работы.

2. По данным рисунка 11 можно заключить, что трансфекция клеток HEK293T векторами pMEL-A0201, pMEL-TCI приводит к масштабной, сравнимой с уровнем мажорных белков клеток человека, экспрессии полноразмерных рекомбинантов A0201, TCI. При этом в клетках HEK 293T не происходит процессинг рекомбинантных белков до пептидов (Рис. 11, б). По данным рисунка 12 иммунохимическое окрашивание препаратов клеток HEK 293T, показывает только отдельные клетки, экспрессирующие антиген, узнаваемый антителами 29F2.

Возможно, что это несоответствие связано с низкой повторяемостью используемого автором варианта метода иммунохимического окрашивания клеточных препаратов.

3. Данные работы показывают, что трансфекция клеток линии HEK293T разработанными конструкциями приводит к транскрипции целевых мРНК и трансляции целевых белков в этих клетках. Вместе с тем, ключевым биологическим объектом работы являются моноклеточные клетки, выделенные из периферической крови здоровых доноров. В работе не представлены данные об экспрессии целевых генов в “моноклеточных клетках, выделенных из периферической крови условно здоровых доноров”.

Указанные замечания носят дискуссионный характер и не снижают ценности полученных результатов, актуальности, фундаментальной и практической значимости диссертационной работы Бороновой Елены Александровны.

Заключение: диссертационная работа Бороновой Елены Александровны «Разработка и изучение свойств искусственных полиэпигенных антигенов меланомы», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, представляет собой законченное исследование, выполненное современными методами. В диссертации представлены новые подходы к созданию средств профилактики и терапии злокачественной меланомы кожи человека.

По актуальности темы, новизне полученных результатов и их теоретической значимости диссертационная работа Бороновой Е.А. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, критериям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., а ее автор, Боронова Елена Александровна, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности «03.01.03 – молекулярная биология».

Старший научный сотрудник
Лаборатории биотехнологии
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН (ИХБФМ СО РАН)
630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, д. 8



Д.В. Семенов

к.х.н., доцент

<http://www.niboch.nsc.ru/>
semenov@niboch.nsc.ru

7(383)3635189

09.04.2019

Подпись Семенова Д.В. заверяю

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН



П.Е. Пестряков