

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук АЛИЕВОЙ Ругии Шахрияр кызы
на тему: «НЕКОВАЛЕНТНЫЕ ДИМЕРЫ АПТАМЕРОВ К ТРОМБИНУ И
РЕЦЕПТОРУ ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА»
по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия»

Актуальность избранной темы. Аптамеры на основе ДНК, РНК и их модифицированных аналогов обладают уникальным сочетанием характеристик. С одной стороны, они демонстрируют высокую аффинность и специфичность связывания молекулярных мишеней. С другой стороны, по своей химической природе они являются олигонуклеотидами, и это открывает широчайшие возможности для химического синтеза аптамеров, введения в их состав разнообразных модификаций и использования аптамеров в качестве блоков для создания мультифункциональных конструкций с заданными свойствами. Закономерно, что создание аптамеров и конструкций на их основе вызывает большой интерес у исследователей в области биоорганической химии нуклеиновых кислот и молекулярной биологии как с фундаментальной точки зрения, так и в плане применения для разработки новых диагностических тест-систем и потенциальных таргетных терапевтических препаратов. В последнем случае особенно важной становится проблема регулирования сродства аптамерной конструкции к мишени. Свойства аптамеров позволяют объединять несколько узнающих мишень модулей в составе одной конструкции, повышая тем самым avidность связывания. Поэтому очень актуальной задачей является разработка новых подходов к созданию мультимодульных аптамерных конструкций. В русле этой тематики лежит диссертационная работа Р.Ш. Алиевой, которая посвящена созданию и характеристике нековалентных димеров на основе аптамеров, направленных на терапевтически значимые белки – мишени, тромбин и рецептор эпидермального фактора роста.

Научная новизна и достоверность результатов исследования. В работе получен ряд новых научно значимых результатов. Получены и всесторонне охарактеризованы новые нековалентные димеры ДНК-аптамеров к тромбину.

Проведен сравнительный анализ различных способов димеризации. Сконструированы и исследованы нековалентные димеры аптамеров к димерному поверхностному белку – рецептору эпидермального фактора роста, показана их способность ингибировать рецептор, а также проникать в клетки. В работе использованы самые современные методы биоорганической химии, физической химии и молекулярной биологии, для обработки результатов и математического моделирования соискатель использовала современные программные пакеты. Все это позволяет уверенно говорить о высокой степени достоверности полученных результатов.

Структура и содержание работы. Диссертация Алиевой Р.Ш. изложена на 108 страницах машинописного текста, и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части и выводов. Основной текст иллюстрирован 32 рисунками и 11 таблицами.

Во «Введении» обоснована актуальность проблемы исследования и оценивается степень ее разработанности, сформулированы цели и поставлены задачи работы, оценены научная новизна и значимость результатов, сформулированы положения, выносимые на защиту. В обзоре литературы рассмотрены общие принципы создания мультимерных конструкций на основе аптамеров, и существующие на данный момент подходы к созданию таких конструкций. Особое внимание уделено аптамерам к тромбину и способам их ковалентной и нековалентной димеризации. Отдельный раздел посвящен рецептору эпидермального фактора роста и аптамерам к этому белку.

В диссертации выполнен достаточно большой объем экспериментальной работы, причем для этого использованы самые современные методы исследований – КД-спектроскопия, биослойная интерферометрия, эксклюзионная ВЭЖХ, ЯМР-спектроскопия аптамерных димеров, проточная цитометрия и конфокальная микроскопия. Применение разнообразного арсенала методов позволило автору всесторонне охарактеризовать созданные аптамерные конструкции и провести сравнительный анализ их эффективности.

Полученные результаты изложены и проанализированы в главе «Результаты и обсуждение». К моменту начала данного исследования не были подробно описаны нековалентные димеры аптамеров, в которых димеризация реализована через

образование межмолекулярного G-квадруплекса. Для исследования формирования димеров были специально оптимизированы условия эксклюзионной ВЭЖХ, и это позволило количественно оценить соотношение мономерной и олигомерных форм для каждого варианта конструкции и выбрать наилучшие варианты конструкций и условий их формирования. Разработанная методология была далее использована при изучении нековалентных димеров, сформированных за счет образования межмолекулярного дуплекса. Важно отметить, что аптамерные модули в составе димеров сохраняют сродство к белку-мишени и способность ингибировать его функциональную активность. Подход к димеризации через межмолекулярные дуплексы был далее успешно использован автором для создания серии аптамерных димеров к принципиально другой белковой мишени – поверхностному рецептору эпидермального фактора роста, гиперэкспрессия которого характерна для опухолевых клеток. Исследование взаимодействия с клетками показало, что для ДНК-аптамеров характерно эффективное связывание с клетками и проникновение с локализацией в ядре. При этом димер ДНК-аптамера проникал более эффективно в сравнении с мономерной формой. В случае РНК-аптамера, напротив, способностью проникать в ядро обладал только мономер, но не димерная конструкция. Для димерного ДНК-аптамера продемонстрировано более выраженное снижение выживаемости опухолевых клеток по сравнению с мономером.

Содержание автореферата соответствует всем основным результатам, полученным соискателем. По теме диссертационной работы опубликованы 3 статьи в рецензируемых журналах и тезисы докладов на 2 конференциях.

В целом работа производит благоприятное впечатление объемом экспериментальных данных, разнообразием и современным уровнем используемых подходов, логичным и последовательным планированием экспериментов и изложением результатов.

Общие замечания. К диссертационной работе и автореферату есть ряд замечаний и вопросов, которые приведены ниже:

- При обсуждении литературных данных автор сравнивает аффинность аптамеров, опираясь на значения констант диссоциации комплексов аптамер-мишень. Известно, что в зависимости от конкретного метода определения значения констант для одного и того же комплекса

аптамер-мишень могут значительно различаться. Поэтому стоило бы упоминать метод, которым было получено то или иное значение K_D . Так, например, в таблицах 1 и 2 (обзор литературы) приведены значения констант диссоциации комплексов аптамеров HD1 и 60-29 с тромбином, при этом между таблицами значения различаются. В чем в данном случае может быть причина таких различий? В таблице 3 приведены константы диссоциации комплексов аптамеров с полноразмерным белком EGFR, однако остается неясным: был ли это белок в растворе или рецептор на клеточной поверхности, и каким именно способом были определены значения констант.

- Оформление таблицы 4 очень затрудняет работу с ней, заголовки столбцов прочитать трудно.
- Как показано в разделе по оптимизации условий эксклюзионной ВЭЖХ, условия хроматографии значительно влияют на соотношение мономерной и олигомерной форм аптамера. Насколько уверенно в таком случае можно распространять наблюдаемую на ВЭЖХ картину на реальное соотношение форм в растворе?
- Рисунок 20 (стр. 55) никак не упомянут и не обсужден в тексте.
- При конструировании димеров на основе аптамеров к эпидермальному фактору роста - как именно были выбраны нуклеотидные последовательности фрагментов, обеспечивающих формирование межмолекулярных дуплексов? Этот момент автор не обсуждает, хотя именно от длины и последовательности этих фрагментов зависит сохранение аффинности отдельных модулей к мишени и возможность взаимодействия аптамерного димера с димерным белком.
- В экспериментах по исследованию взаимодействия анти-EGFR аптамеров с клетками для подтверждения специфичности взаимодействия уместно было бы использовать контрольную клеточную линию неопухолевого происхождения.
- Список публикаций по теме диссертационной работы включает в себя тезисы докладов, посвященные исследованию связывания ДНК-аптамеров к рецептору эпидермального фактора роста с клетками

интерферометрическим методом, но в диссертации и автореферате такие эксперименты не описаны.

- На фотографиях, иллюстрирующих результаты конфокальной микроскопии (рисунки 30, 31, 32), не указан масштаб изображения. На рисунках 31 и 32 фотографии контрольных клеток приведены в меньшем масштабе по сравнению с фотографиями экспериментальных групп, что видно по размерам ядер. Это затрудняет для читателя визуальную оценку результатов, особенно в случае рис. 32, где на контрольных панелях Б и В вообще сложно что-либо рассмотреть. Картина распределения флуоресцентного сигнала на рис. 32А может говорить о неспецифическом связывании флуоресцентно меченого аптамера. Для исследования использована конфокальная микроскопия, поэтому для прояснения данного вопроса стоило бы использовать данные флуоресцентных сигналов от разных оптических срезов.
- В некоторых случаях в разделе «Методы» не приведены методики экспериментов, описанных в главе «Результаты и обсуждение». Так, раздел 2.1.4 посвящен оценке функциональной активности антиромбиновых аптамеров в коагуляционном тесте, но методика проведения теста и источник образцов человеческой плазмы в Экспериментальной части не описаны. В разделе 2.2.5. описаны результаты теста метаболической активности клеток, но соответствующая методика также не приведена.
- В Выводе 3 автор сравнивает эффективность образования димерных конструкций в терминах «выше» и «существенно выше». С моей точки зрения, здесь необходимо использовать конкретные значения.

Кроме того, в тексте присутствует ряд опечаток, неудачных выражений и терминологических небрежностей.

Приведенные замечания носят дискуссионный либо рекомендательный характер и не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.4.9 – «Биоорганическая

химия» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель АЛИЕВА Ругия Шахрияр кызы заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия».

Официальный оппонент,

кандидат химических наук

старший научный сотрудник лаборатории химии РНК

ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

ВОРОБЬЕВА Мария Александровна

__ января 2023 г.

Контактные данные:

тел.: 7(383)3835129, e-mail: kuzn@niboch.nsc.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:

02.00.10 – Биоорганическая химия

Адрес места работы:

630090, Российская Федерация, Новосибирская область, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8

Федеральное государственное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского Отделения Российской Академии Наук

Тел.: 7(383)3835151; e-mail: niboch@niboch.nsc.ru

Подпись сотрудника

ИХБФМ СО РАН М.А. Воробьевой удостоверяю:

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН,

кандидат химических наук

Д.С. Новопашина