

ОТЗЫВ официального оппонента
о диссертации 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 темы

Исследованные в работе Р.Ш. Алиевой подходы к конструированию димерных аптамеров представляют большой интерес в контексте дизайна олигонуклеотидных ингибиторов терапевтически значимых мишеней и создания новых систем внутриклеточной доставки. В теории, димеризация и мультимеризация аптамеров не только позволит повысить их эффективность за счет увеличения avidности, но может также положительно сказаться на фармакокинетических параметрах за счет увеличения молекулярной массы.

Обе рассмотренные в работе мишени аптамеров – тромбин и рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) – терапевтически значимы; их блокаторы имеют перспективы практического применения в качестве антикоагулянтов и противоопухолевых средств соответственно. Лиганды к EGFR могут быть использованы и в роли компонентов препаратов направленного действия для обеспечения избирательности к опухолевым клеткам. В то же время обе мишени можно назвать удачными модельными объектами. Пара тромбин-антитромбиновый аптамер HD1 была охарактеризована одной из первых. На сегодняшний день закономерности комплексообразования данной пары изучены всесторонне. Выбор этой пары в качестве основы для отработки подходов к оптимизации аптамера путем димеризации закономерен. EGFR является удобной моделью димеризующейся мишени – ключевого элемента сигнального каскада, причем лиганд-зависимая димеризация инициирует его активацию. Для таких мишеней особенно важно отследить различия в эффектах

мономерных/димерных лигандов. В фундаментальном плане результаты исследования значимы для прояснения рассмотренных в обзоре литературы ключевых типов комплексообразования модульных лигандов с мультивалентной мишенью (перекрестное связывание, повторное связывание, стерическое экранирование и т.д.). Таким образом, в диссертации обсуждаются существенные аспекты современной биоорганической химии и молекулярной биологии; актуальность темы не вызывает сомнений.

Новизна исследования

В отличие от антител, аптамеры сравнительно легко могут быть спроектированы и получены в формате различных модульных конструкций – гомо- или гетеро-димеров с ковалентными или нековалентными линкерами. Теме не менее, исследования в этой области ведутся сравнительно недавно и далеки от завершения. Ковалентное связывание нескольких аптамерных модулей в рамках единой конструкции описано в литературе и имеет свои преимущества – в частности, свойства итоговой конструкции не должны зависеть от концентрации. Нековалентное связывание аптамеров открывает большие возможности в плане модуляции активности аптамеров, но примеры использования данного подхода единичны. Работа Р.Ш. Алиевой продолжает новаторские исследования проф. А.М. Копылова и Е.Г. Завьяловой. В работе впервые исследованы сравнительные преимущества различных вариантов нековалентной димеризации аптамеров через квадруплексные и дуплексные линкеры.

Обоснованность научных положений и выводов

Все ключевые положения и выводы представляются обоснованными. Убедительно показана возможность конструирования димерных аптамеров, а также их анализа и разделения методом эксклюзионной хроматографии. Анализ факторов, влияющих на степень димеризации, выполнен достаточно добросовестно. Ряд промежуточных тезисов и методологических подходов стоило обосновать подробнее. Например, неочевидно, за счет чего реализуется противоопухолевая активность ДНК-аптамеров к EGFR, если принять тезис об

их интернализации вместе с EGFR и попадание в ядро. Данная тема не раскрыта. Поскольку димеризацию и активацию EGFR можно считать нежелательным событием, ассоциированным с пролиферацией опухолевых клеток, стоило детально обсудить, каков был ожидаемый эффект димеризующихся аптамеров. Еще один вопрос, заслуживающий обсуждения, – вероятность индуцированной димерным лигандом димеризации тромбина. Также имеются замечания по интерпретации и оформлению результатов экспериментов. Они перечислены ниже.

1. Оформление рисунков в обзоре литературы оставляет желать лучшего. Ярким примером является Рис. 5, на котором представлены гомо- и гетеродимеры аптамеров к тромбину. Все они содержат модуль HD1. Схематическое представление этого модуля различно в панелях А, Б и В-Г. В пределах единого рисунка одинаковые объекты принято изображать однотипно, в противном случае схема несколько дезориентирует читателя. В панели Б указан размер молекулы тромбина – 3.4 нм. Непонятно, почему на этом сделан акцент, и каким образом должна использоваться эта информация.

2. Эксклюзионная хроматография. Калибровочная кривая в координатах “логарифм мол. веса – относительный объем удерживания” аппроксимирована линейной зависимостью. Коэффициент $R^2 = 0.99$ указывает на достоверную аппроксимацию, что неудивительно для дуплексов. Ключевой вопрос – насколько калибровка по дуплексам пригодна для анализа квадруплексов? Как диссертантка оценивает роль фактора формы? Стоило показать в явном виде калибровочную кривую (по дуплексам) и отметить на ней относительный объем удерживания димерных аптамеров. Также было бы полезно отметить на том же графике объемы удерживания и мол. вес. известных мономерных и димерных квадруплексов для верификации вклада фактора формы.

3. Как соотносится диапазон концентраций, необходимый для получения высокого выхода нековалентных димеров аптамеров к тромбину, с терапевтическим окном? Совместимы ли эти концентрации с практическим применением? Кроме того, учитывая зависимость доли димера от

концентрации, не ожидается ли перераспределения аптамера между димерной и мономерной формами после выделения димера методом эксклюзионной хроматографии и переноса в биологическую среду?

4. Хотелось бы большей четкости в указании составов буферных растворов. В подписи к Рис. 17. упоминается 20 мМ фосфат натрия. Подразумевается смесь гидрофосфата и дигидрофосфата? Стоило указать их соотношение или pH буфера. В разделе “Экспериментальная часть” для buf1.10K указано следующее: “20 мМ PBS, 10 мМ KCl, 140 мМ NaCl”. Аббревиатурой “PBS” традиционно обозначают фосфатно-солевой буфер (phosphate buffer saline), куда уже входит хлорид натрия/калия. Состав буферных растворов также стоило указать в подписях к Рис. 19 и 20.

5. Раздел 2.1.2, Рис. 22 – спектроскопия ЯМР. Указано, что расчетное количество сигналов (видимо в характерной для G4 области 10.5-12 ppm) соответствует 16 иминовым протонам, т.е. четырем тетрадам. Неочевидно, что принято за 1 при интегрировании. Стоило также прокомментировать ожидаемое число пиков – 16 сигналов иминовых протонов линкерного межмолекулярного квадруплекса и еще две одинаковых группы по 8 протонов от HD1 (итого 32) или иное?

6. Рис 23. Величина молярного кругового дихроизма в характерных полосах антипараллельного квадруплекса практически не отличается для мономерного и димерного аптамеров. Нет ли здесь ошибки нормировки? Разве четыре дополнительные тетрады линкерного межмолекулярного квадруплекса не должны были увеличить амплитуду?

7. Стр. 60. Температурная зависимость поглощения в 295 нм характерна не только для антипараллельных квадруплексов (но и для параллельных). Также температурная зависимость поглощения при 260 нм характерна не только для дуплексов. В таблице 6 указано, что квадруплексы при денатурации не меняют УФ-поглощение в 260 нм. Корректно ли это?

8. Раздел 2.1.4. - функциональная активность аптамеров к тромбину. На стр. 63 приводится сравнение ингибирующей активности нековалентных

аптамеров и ковалентного аптамера RA-36. Делается вывод о том, что в нековалентных аптамерах модули независимы, а в ковалентном они действуют как единая структура. Сравнение было бы корректно, если бы длина линкера между аптамерными модулями в ковалентном и нековалентном димерах была одинакова, но в ковалентном линкер значительно короче. Возможно ли, что именно это объясняет разницу?

9. Раздел 2.2.3. Аптамеры к EGFR протестированы на клетках линии эпидермальной карциномы. Вероятно, в будущем целесообразно в качестве дополнительного контроля использовать клетки другой линии, слабо экспрессирующие EGFR. Это пожелание связано с тем, что увеличение молекулярной массы за счет димеризации теоретически могло бы способствовать переключению с рецептор-опосредованного эндоцитоза на макропиноцитоз.

10. Рис. 30. Желательно было бы проставить масштаб. На стр. 74 в тексте “на Рис.30 красным цветом выделены клетки, в которых аптамер окрашивает ядро полностью, а желтым цветом – клетки, в которых наблюдается окрашивание субструктур ядра, а именно, ядрышек.”, по-видимому, подразумевалась ссылка на Рис. 32. Можно ли на основании одной морфологии утверждать с уверенностью, что субструктуры ядра – это именно ядрышки, а не иные образования (гетерохроматин, спеклы и т.д.)?

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Работа выполнена на высоком методическом уровне. 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:

доктор химических наук,
заведующая лабораторией структуры и функций биополимеров
отдела клеточной биологии
Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»

Варижук Анна Михайловна

09.01.2023

Контактные данные:

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.01.03 – Молекулярная биология

Подпись сотрудника лаборатории структуры и функций биополимеров
Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»

удостоверяю:

Ученый секретарь, к.б.н.

О.П. Лихнова

09.01.2023