

ОТЗЫВ официального оппонента

**на диссертационную работу Шафикова Радика Радиковича на тему:
«Структурно-функциональная характеристика лигандов маркера рака простаты GSPH и анализ регуляции экспрессии кодирующего его гена *FOLH1*», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология»**

Актуальность темы выполнения работы

Диссертация Шафикова Радика Радиковича посвящена биологической характеристике *in vitro* лигандов маркера рака простаты GSPH, их конъюгатов с флуоресцентными и цитотоксичными молекулами, а также поиску регуляторов экспрессии гена *FOLH1*, кодирующего GSPH. Выявление лигандов, эффективно ингибирующих GSPH в зависимости от структуры и природы заместителей, необходимо для направленного дизайна соединений с улучшенными целевыми характеристиками. Идентификация регуляторов транскрипции гена *FOLH1* в клетках рака простаты может помочь в поиске новых мишеней для диагностики и терапии этого заболевания.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Шафикова Р.Р. изложена на 110 страницах печатного текста, содержит 21 рисунок и 13 таблиц. Работа построена по традиционной схеме и включает в себя следующие разделы: «Оглавление», «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», «Список литературы» и «Приложения». Список используемой литературы составляет 131 источник, большая часть которых представляет собой недавно опубликованные статьи в ведущих мировых журналах.

Содержание диссертации

Во введении кратко изложены актуальность проблемы, степень разработанности темы, цели, задачи, объекты и предметы исследования,

научная новизна, теоретическая и практическая значимость, а также использованная в работе методология. Здесь же даны основные положения, выносимые на защиту, приведена информация об апробации работы, количестве публикаций и личном вкладе автора.

Обзор литературы разбит на два раздела. Первый раздел посвящен ингибиторам GСРП. Диссертант описывает взаимодействия между структурными элементами ингибиторов GСРП (P1, P1', линкер и дипептидный фрагмент) и участками их связывания внутри фермента (S1, S1', арен-связывающий сайт). Для каждого фрагмента лиганда приведено описание взаимосвязи структура-активность, позволяющее делать вывод о влиянии тех или иных модификаций соединений на значения константы ингибирования GСРП. Благодаря этому сформирована задача проверки таких лигандов GСРП, в которых сочетаются заместителя, улучшающие связывание одновременно с несколькими участками в полости фермента. Во втором разделе кратко описаны принципы транскрипционной регуляции, затем – известные цис- и транс-регуляторы экспрессии гена *FOLH1*, на основании чего делается вывод о недостаточной их изученности и формируется задача поиска регуляторов транскрипции гена *FOLH1* в клетках опухоли простаты.

Глава «Материалы и методы» содержит описание широкого спектра современных молекулярно-биологических и биохимических подходов, сформированных в работе. Среди них дизайн и создание генетических конструкций, методы работы с клеточными культурами, методы оценки ферментативной активности GСРП и цитотоксичности его лигандов, проточная цитофлуориметрия и флуоресцентная микроскопия, работа с вирусами и лентивирусными библиотеками. Все методики описаны достаточно подробно, что позволяет их воспроизвести и использовать в лабораторных протоколах.

Глава «Результаты» содержит два раздела. Первый раздел посвящен лигандам GСРП. В нем описаны исследованные взаимосвязи структура-активность новых ингибиторов GСРП и характеристики конъюгатов

ингибиторов GСРII с цитотоксичными и флуоресцентными молекулами, синтезированных коллегами Шафикова Р.Р. Были оценены константы ингибирования соединений трех поколений лигандов GСРII, для некоторых из них протестирована цитотоксичность на клеточных линиях разной этиологии. Анализ результатов экспериментальной оценки лигандов поколения А показал отсутствие строгой зависимости между энантиомерией дипептидного фрагмента лиганда и значением константы ингибирования. На лигандах поколения В продемонстрировано, что (L,L) конфигурация дипептидного фрагмента приводит к меньшим значениям константы ингибирования фермента, однако это правило может нарушаться в зависимости от присутствия разных заместителей в фрагментах P1 и AR_{ABS1}, AR_{ABS2} лигандов GСРII. На лигандах поколения С показано, что при использовании нитро-, карбокси- и алкокси-групп в качестве заместителей в AR_{P1} и AR_{ABS2} фрагментах лиганда GСРII можно также добиться низких значений константы ингибирования. Диссертант показал, что конъюгат нецитотоксичного лиганда В15 с SulfoCy5 способен эффективно окрашивать GСРII-содержащие клетки, причем интенсивность сигнала отражает уровень экспрессии гена *FOLH1*. Данное свойство флуоресцентных лигандов было использовано при поиске потенциальных регуляторов экспрессии гена *FOLH1* во втором разделе.

Второй раздел посвящен поиску регуляторов экспрессии гена *FOLH1*. Для этого Шафиков Р.Р. использовал несколько подходов, на основании результатов применения которых сформирована сводная таблица потенциальных регуляторов. Был проведен анализ транскриптомных данных для образцов опухоли простаты и клеточных линий, который позволил выделить транскрипционные факторы и протеинкиназы, дифференциально экспрессируемые при сравнении выборок с высокой и низкой экспрессией гена *FOLH1*. На основании анализа базы данных нокаутов и нокдаунов транскрипционных факторов отобраны те белки, которые ранее не рассматривались в качестве регуляторов транскрипции гена, но влияли на уровень его экспрессии. Экспериментальный поиск потенциальных

регуляторов проведен с помощью скрининга лентивирусной библиотеки последовательностей sgRNA для системы CRISPR-Cas9. Инкубация пула клеток, каждая из которых статистически экспрессировала только одну sgRNA из полногеномной библиотеки, с флуоресцентным лигандом, исследованным в первом разделе, позволила с помощью клеточного сортера выделить две популяции клеток: одну – с наименьшим флуоресцентным сигналом, что свидетельствовало о низкой экспрессии *FOLH1* в этих клетках, другую – с наибольшим значением флуоресцентного сигнала. В первом случае предполагалось, что осуществлен нокаут «активатора», во втором – «репрессора» экспрессии гена. После двух стадий сортировки были подготовлены ампликоны, содержащие последовательности sgRNA. По результатам анализа данных секвенирования ампликонов сформирован пул генов, чьи нокауты приводили либо к увеличению, либо к уменьшению экспрессии *FOLH1*.

Обсуждение результатов поделено между двумя разделами, один из которых посвящен лигандам GСPII, а другой – поиску регуляторов экспрессии гена *FOLH1*. Шафиков Р.Р. рассматривает полученные результаты в свете имеющихся литературных данных по изучаемым проблемам. Интерпретация экспериментальных результатов, предложенная соискателем, аргументирована.

Раздел «Выводы» дает представление о масштабе проделанной работы, а также новизне и актуальности полученных данных.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

В диссертационном исследовании впервые определены константы ингибирования свыше сорока синтезированных соединений с различными комбинациями заместителей, направленных на участки связывания S1 и ABS в GСPII. Это позволило определить ряд зависимостей структура-активность для новых лигандов GСPII. Исследованы конъюгаты лигандов GСPII с

цитотоксическими и флуоресцентными молекулами. С использованием данных, полученных в этой работе, подана заявка на патент. Также в диссертации проанализированы возможные регуляторы экспрессии *FOLH1* с использованием нескольких *in silico* и экспериментальных подходов.

Достоверность и обоснованность результатов исследования, их новизна

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием комплекса современных методов исследований, продуманным анализом полученных данных и сопоставлением их с известными из литературы фактами. Выводы соответствуют содержанию работы и позволяют считать основную цель работы достигнутой. Содержание автореферата полностью отражает суть работы, основные результаты и выводы диссертации. Результаты диссертации отражены в 4 научных статьях, опубликованных в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science и Scopus, а также доложены на 4 конференциях.

При ознакомлении с диссертацией у оппонента возникли следующие вопросы и замечания:

-Автор в тексте использовал сложные для восприятия формулировки, что затруднило восприятие материала. Например, первая задача сформулирована очень туманно: «Исследовать структурно-функциональную зависимость новых низкомолекулярных лигандов GСPII для улучшения их взаимодействия с мишенью». Хотелось бы более простого и понятного текста, например: «Определить влияние структурных элементов лигандов GСPII на их способность ингибировать функцию белка».

-В работе выявлено, что транскрипционный фактор MAZ, является активатором транскрипции *FOLH1* в клетках опухоли простаты 22Rv1. Однако никаких подробностей про этот транскрипционный фактор не приведено. Интересно было бы узнать, чем этот фактор характеризуется.

Однако необходимо отметить, что вышеизложенные замечания носят частный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту диссертации, и не снижают общую положительную оценку работы.

Заключение

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.3 – «молекулярная биология» (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 Шафиков Радик Радикович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Доктор биологических наук, член-корреспондент РАН,
главный научный сотрудник, Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта
Российской академии наук

Митькевич Владимир Александрович

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

01.05.03 – Молекулярная биология

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук

Подпись Митькевича В.А. удостоверяю

Ученый секретарь ИМБ РАН, к.в.н.

Бочаров А.А.