

ОТЗЫВ официального оппонента
о диссертации на соискание ученой степени кандидата
химических наук Шафикова Радика Радиковича на тему:
«Структурно-функциональная характеристика
лигандов маркера рака простаты GСPII и анализ
регуляции экспрессии кодирующего его гена *FOLH1*»
по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология»

Актуальность избранной темы

Исследование биологически активных соединений и поиск ключевых внутриклеточных регуляторов являются важными элементами разработки новых методов лечения заболеваний. В работе Шафикова Р.Р. поставлены две актуальные задачи, позволяющие взглянуть на маркер рака простаты с двух сторон: это воздействие на белок GСPII, который может использоваться для адресной доставки низкомолекулярных соединений благодаря наличию специфичных к нему лигандов (ингибиторов), и изучение функционирования кодирующего GСPII гена *FOLH1*, высокая и достаточно специфичная экспрессия которого не была объяснена.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Впервые выполнена характеристика *in vitro* нескольких десятков лигандов GСPII, а также конъюгатов на основе соединений с наилучшими ингибирующими характеристиками с цитотоксичными и флуоресцентными молекулами. С помощью экспериментальных подходов и анализа доступных транскриптомных данных сформирован список потенциальных регуляторов экспрессии гена *FOLH1*. Использование автором разнообразных и хорошо валидированных экспериментальных и биоинформатических подходов позволяет уверенно утверждать, что полученные Радиком Радиковичем данные достоверны, а сделанные выводы обоснованы.

Структура и объем диссертации

Диссертация Шафикова Р.Р. включает в себя: «Оглавление», «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», «Список литературы» и «Приложения». Список литературы состоит из 131 статьи и обзора, большая часть которых опубликована после 2010 года. Работа занимает 110 страниц, содержит 21 рисунок и 13 таблиц.

Краткая характеристика основного содержания диссертации

Во введении обосновывается выбор темы и объектов исследования, сформулированы актуальность и научная значимость, цели и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, научная новизна результатов, перечислены методы исследования, данные об апробации результатов, отмечен личный вклад автора.

Обзор литературы разбит на две части. В первой части всесторонне рассматривается вклад модификаций разных фрагментов ингибиторов белка в их взаимодействие с ферментом, отраженное в значениях констант ингибирования или концентрации полумаксимального ингибирования GСPII. Подразделы посвящены участкам связывания субстрата внутри фермента – участку узнавания глутамата, каталитическому центру, S1 участку связывания субстрата и арен-связывающему сайту. Описано, как «груз» в виде хелаторов, флуоресцентных и цитотоксичных молекул может влиять на показатели ингибирования GСPII. Из этой части обзора делается вывод о недостаточности систематического изучения влияния заместителей на ингибирующие свойства лигандов GСPII. Вторая часть обзора посвящена транскрипционной регуляции гена *FOLH1*, который кодирует GСPII. Здесь Шафиков Р.Р. заостряет внимание на методах, с помощью которых установлены те или иные цис- и транс-регуляторы транскрипции *FOLH1*. В начале кратко приведены принципы транскрипционной регуляции генов, транскрипция которых

осуществляется ДНК-зависимой РНК-полимеразой II, обоснована причина, по которой именно транскрипция выбрана лимитирующей стадией в регуляции экспрессии *FOLH1*. Затем описаны цис-регуляторные последовательности гена – промотор и энхансер, а также известные транс-регуляторы – транскрипционные факторы, которые объясняют лишь небольшую долю тканеспецифичной экспрессии исследуемого гена. На основании этого делается вывод о малой изученности регуляции транскрипции гена *FOLH1*.

В разделе «Материалы и методы» описано большое количество разнообразных молекулярно-биологических, клеточных, биохимических и биоинформатических методов, используемых в данной работе. Они описаны достаточно подробно, хотя есть несущественные стилистические недостатки.

Результаты диссертации изложены логично и иллюстрированы рисунками хорошего качества. Автор охарактеризовал *in vitro* более четырех десятков новых ингибиторов GСРII, в том числе конъюгаты ингибитора В15 с SulfoCy5, SulfoCy7 и монометил ауристатином Е. Благодаря высокой специфичности конъюгата В15-Сy5 к GСРII-содержащим клеткам этот конъюгат был также использован в одном из подходов при поиске потенциальных регуляторов экспрессии гена *FOLH1*, который кодирует GСРII. Полученные в результате обработки лентивирусной библиотекой последовательностей геновых РНК Gecko v2 клетки были окрашены, популяции клеток с наибольшим и наименьшим флуоресцентным сигналом были отобраны на проточном цитофлуориметре. Процедура проводилась дважды, в промежутке между первой и второй сортировкой клетки размножали до необходимого количества. Анализ секвенирования ампликонов, содержащих последовательности геновых РНК, позволил выявить гены, чьи нокауты приводили к увеличению или уменьшению экспрессии гена *FOLH1*. На основании проведенного скрининга и нескольких *in silico* подходов сформирован ранжированный пул потенциальных регуляторов экспрессии *FOLH1*.

В разделах «Обсуждение результатов» автор смог всесторонне критически рассмотреть полученные результаты и соотнести их с известными литературными данными. Полученные автором данные имеют не только фундаментальную, но и практическую ценность для диагностики и, потенциально, терапии рака простаты.

Следует отметить, что результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях, а также были опубликованы в научных журналах, индексируемых базами данных Scopus и Web of Science.

Выводы в диссертационной работе сформулированы ясно, они полностью отражают проделанную работу.

Замечания по работе

К работе нет вопросов принципиального характера, которые бы повлияли на общую высокую оценку уровня проведенных исследований и достоверности полученных результатов, однако есть несколько замечаний и вопросов:

1. Почему для тестирования конъюгатов в качестве ингибитора была выбрана молекула В15, а не С4 или С13, для которых константа ингибирования ниже, то есть они, потенциально, могут быть более эффективными для применения в терапии и диагностике?
2. В качестве дискуссии хочу предложить вопрос: можно ли сделать предположение о механизме снижения цитотоксичности конъюгата В15 с монометил ауристатином Е по сравнению с исходным цитостатиком?
3. И общий вопрос, не входящий в рамки представленной работы: белок GСРII экспрессируется не только в опухолях простаты, но и в норме в простате, проксимальных канальцах почек и некоторых отделах двенадцатиперстной кишки. Какие последствия ингибирования GСРII в ходе терапии опухоли могут быть на уровне организма?

4. Небольшое замечание – литературный обзор посвящен роли маркера рака простаты GSPH, его ингибиторам и регуляции кодирующего его гена. На взгляд оппонента, использование лентивирусных библиотек на основе системы модификации генома CRISPR/Cas9 для полногеномного нокаута генов является достаточно новым методом, который имело смысл описать в Литературном обзоре, тем более, что есть методически схожие работы по изучению действия противораковых лекарств.

Заключение

Вместе с тем, указанные замечания 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 1.5.3 – «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:

кандидат биологических наук,

ведущий научный сотрудник сектора клеточных коллекций

Федерального государственного бюджетного научного учреждения

«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики

Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Мензоров Алексей Гаврилович

28.11.2022

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.02.07 – генетика

Адрес места работы:

630128, г. Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, д. 10,

ИЦиГ СО РАН, сектор клеточных коллекций

Подпись сотрудника

ИЦиГ СО РАН А.Г. Мензорова удостоверяю:

Ученый секретарь ИЦиГ СО РАН, к.б.н.

Г.В. Орлова

дата