

## О Т З Ы В

**официального оппонента о диссертации**

**на соискание ученой степени кандидата химических наук**

**Шафикова Радика Радиковича на тему:**

**«Зависимость структура-активность лигандов маркера рака простаты GСРII и анализ регуляции экспрессии кодирующего его гена *FOLH1*»  
по специальности 1.5.3 «молекулярная биология»**

Диссертационная работа Шафикова Радика Радиковича «Зависимость структура-активность лигандов маркера рака простаты GСРII и анализ регуляции экспрессии кодирующего его гена *FOLH1*» посвящена развитию важного междисциплинарного научного направления, базирующегося на методологии молекулярной биологии и медицинской химии, – созданию новых подходов для поиска эффективных диагностических или терапевтических методов для лечения опухолевых заболеваний.

Это направление является крайне **актуальным** и ориентировано на поиск перспективных низкомолекулярных соединений или их конъюгатов с различными биологическими маркерами - агентов на основе лигандов известных мишеней, участвующих в патогенезе злокачественных новообразований, с целью создания лекарственных препаратов нового поколения.

Диссертация Шафикова Р.Р. представляет значительный интерес как с точки зрения фундаментальных исследований в области молекулярной биологии и медицинской химии, так и с точки зрения практического применения новых диагностикумов, химиотерапевтических препаратов в качестве кандидатов в лекарственные средства или диагностические агенты, а также средств адресной доставки низкомолекулярных терапевтических и диагностических веществ в клетки опухолей.

Установление взаимосвязи структура-активность для лигандов (ингибиторов) фермента глутаматкарбоксипептидазы II GСРII (простат-

специфичного мембранного антигена - PSMA), который кодируется геном *FOLH1*, может использоваться для предсказания свойств новых соединений и их рациональному дизайну, а потенциальные регуляторы экспрессии *FOLH1* могут пролить свет на работу регуляторных каскадов в простате и раке простаты и, возможно, помочь в поиске новых мишеней биологически активных веществ.

Диссертационная работа Шафикова Р.Р. представляет собой комплексное исследование, включающее, во-первых, установление взаимосвязи структура-активность для ингибиторов GСPII (исследовано свыше 40 веществ), а также низкой цитотоксичности и специфического окрашивания GСPII-содержащих клеток опухоли простаты новыми конъюгатами ингибиторов GСPII с флуоресцентными молекулами SulfoCy5 и SulfoCy7, и во-вторых, определение пула вероятных регуляторов транскрипции гена *FOLH1* в клеточных линиях рака простаты. В задачи работы входило также выявление закономерностей «структура – активность» (SAR) в ряду новых конъюгатов и установление субстанций-лидеров, представляющих интерес для дальнейшего исследования в качестве терапевтических или диагностических агентов.

Диссертационная работа Шафикова Р.Р. изложена на 110 страницах, содержит 21 рисунок, 13 таблиц и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения результатов, заключения, выводов, списка цитируемой литературы (131 литературный источник) и приложения. В тексте диссертации представлены также публикации по теме диссертации.

Во введении обсуждается актуальность, новизна, практическая и теоретическая значимость результатов работы, апробация результатов и формулируются основные положения, выносимые на защиту, обосновывается выбор объектов исследования.

Обзор литературы разделен на две части. В первой части приводится обоснование использования белка GСPII в качестве мишени для диагностики

рака простаты, описание взаимосвязи структура-активность для более чем сотни ингибиторов GСРІІ, что свидетельствует о том, как их структурные особенности влияют на ингибирующие характеристики. Вторая часть посвящена транскрипционной регуляции гена *FOLH1*, кодирующего фермент GСРІІ. В ней рассматриваются известные регуляторные последовательности гена и белки-транскрипционные факторы. Приведенных в обзоре данных достаточно для понимания актуальности цели работы и постановки задач, решаемых в рамках представленной диссертации.

Раздел «Материалы и методы» содержит полное описание методов, использованных при проведении исследования. Необходимо ответить, что набор методов разнообразен и полностью адекватен поставленным в диссертации задачам. Для установления ингибирующих свойств серий соединений был использован ферментативный тест ингибирования GСРІІ, для оценки их цитотоксичности на клеточных линиях разного происхождения – МТТ-тест. Для оценки специфичности конъюгатов выбранного ингибитора В15 с флуоресцентными молекулами использованы проточная цитофлуориметрия и флуоресцентная микроскопия. При поиске потенциальных регуляторов транскрипции гена *FOLH1* автором использованы *in silico* и экспериментальные подходы: корреляционный анализ транскриптомных данных, анализ базы данных нокаутов и нокдаунов, скрининг лентивирусной полногеномной библиотеки последовательностей гидовых РНК Gecko v2 для системы CRISPR-Cas9. Для скрининга библиотеки Шафиковым Р.Р. предложен подход, позволяющий отслеживать уровень экспрессии *FOLH1* по эффективности окрашивания клеток флуоресцентным лигандом В15-Су5, исследованным в первой части работы, в зависимости от того, влияет ли нокаут гена на уровень GСРІІ в клетке.

В Главе "Результаты и обсуждение" приводятся основные результаты, полученные автором, которые представляют **научную новизну работы**.

Результаты представлены в двух разделах: первый посвящен характеристике лигандов GСРІІ, второй – транскрипционной регуляции гена

*FOLH1*. В первом разделе приводятся константы ингибирования большого ряда соединений и описываются наблюдаемые зависимости структура-активность. Для части лигандов GСPII и конъюгата В15-ММАЕ оценены параметры цитотоксичности, а для конъюгатов В15 с флуоресцентными молекулами показано специфичное окрашивание клеток опухоли простаты, экспрессирующих GСPII. На основании анализа транскриптомных данных, базы данных нокаутов и нокадаунов и результатов скрининга библиотеки Gеско v2 сформирована сводная таблица, в которой потенциальные регуляторы экспрессии *FOLH1* отсортированы в зависимости от того, каким критериям, принятым в разных подходах, они соответствуют. Результаты выполненной экспериментальной валидации транскрипционного фактора MAZ как активатора транскрипции *FOLH1* в клетках опухоли простаты 22Rv1 позволило автору сделать вывод о применимости данной стратегии поиска регуляторов экспрессии *FOLH1*.

Данные результаты, несомненно, определяют **практическую значимость** работы Шафикова Р.Р.

При обсуждении результатов автор описывает связь между полученными при выполнении диссертации результатами и опубликованными данными. В конце диссертации приведены заключение, выводы, список литературы и приложение.

Достоверность экспериментальных данных, полученных при выполнении работы, обеспечивается использованием комплекса современных методов: МТТ тест на клеточных линиях рака простаты - LNCaP, 22Rv1, РС-3, VCF-7, F549, а также нераковых клеточных линиях НЕК293Т, VA-13, проточная цитометрия, флуоресцентная микроскопия, расчетные методы и др.

В целом, результаты, полученные автором, являются новыми, экспериментальная часть значительна по объему, достоверность результатов не вызывает сомнения. Основные результаты диссертации опубликованы в 4 научных статьях, обсуждались на различных конференциях и форумах.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

К работе нет замечаний принципиального характера, которые могли бы повлиять на общую оценку качества полученных результатов и достоверность выводов. Тем не менее можно сформулировать ряд вопросов и замечаний:

1. Нет обоснования, почему автор исследовал влияние заместителей именно в рассматриваемых в диссертации отдельных участках молекулы, в частности,  $AR_{P1}$ ,  $AR_{ABS}$ , а не проводил, например, исследования модификации глутамата в P1' положении заместителя или варьирования расстояния между исследованными  $AR_{P1}$  и  $AR_{ABS}$ ?
2. Остается не вполне понятным, почему для создания конъюгатов с MMAE, SulfoCy5 и SulfoCy5 был выбран ингибитор B15 из поколения B, а не одно из соединений поколения C, у которых значение  $K_i$  ниже, чем у B15?
3. Учитывая, что экспрессия гена *FOLH1* не ограничена тканями простаты и опухоли простаты, непонятно, анализировались ли транскриптомные данные для других тканей.
4. Вызывает удивление тот факт, что в списке публикаций по теме диссертации как в автореферате, так и в тексте диссертации, не приведены имена всех авторов публикаций, а используется сокращение списка участников, как et al.
5. В диссертации отсутствует нумерация глав и их частей, что некоторым образом нарушает четкость построения материала.

Однако, 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 Шафигов Радик Радикович заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.3 «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

доктор химических наук, профессор,  
заведующий кафедрой медицинской химии и тонкого органического синтеза  
химического факультета Федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования «Московский  
государственный университет имени М.В.Ломоносова»

МИЛАЕВА Елена Рудольфовна

Специальности, по которым официальным оппонентом защищена  
диссертация:

02.00.03 (1.4.3.) – Органическая химия,

02.00.08 (1.4.8.) – Химия элементоорганических соединений

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 3

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова

Химический факультет