ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертацию ДЗАРИЕВОЙ ФАТИМЫ МУХАРБЕКОВНЫ

на тему: «Новый ДНК-аптамер Gol1 как инструмент изучения физиологической роли EGFRvIII в регуляции пролиферации и миграции клеток глиобластомы человека»

по специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Актуальность диссертационной работы

Диссертационная работа Фатимы Мухарбековны Дзариевой посвящена одной из наиболее острых проблем современной нейроонкологии – поиску эффективных подходов к терапии глиобластомы. Несмотря на мультимодальное лечение, медиана выживаемости пациентов не превышает 16 месяцев, а 5-летняя выживаемость составляет менее 5%. Ключевой молекулярной мишенью является мутантная форма рецептора эпидермального фактора роста – EGFRvIII, которая обнаруживается исключительно в опухолевых клетках и ассоциирована с усилением пролиферации, миграции и резистентности. Однако отсутствие селективных инструментов, позволяющих специфически блокировать EGFRvIII без влияния на дикий тип EGFR, долгое время сдерживало как фундаментальные исследования физиологической роли этого рецептора, так и разработку таргетных препаратов. В диссертации предложен оригинальный подход – создание нового ДНК-аптамера Gol1, обладающего высокой селективностью к EGFRvIII, и его использование для изучения клеточных и молекулярных механизмов, лежащих в основе злокачественного фенотипа глиобластомы. Актуальность работы не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов

Автором впервые осуществлён рациональный компьютерный дизайн укороченного ДНК-аптамера Gol1 на основе родительской последовательности U2. С помощью молекулярно-динамического моделирования обоснована роль мультипетли с мотивом ATAT в обеспечении селективности связывания. Созданы стабильные трансгенные клеточные модели G01/EGFRwt и G01/EGFRvIII, которые сами по себе являются ценным инструментом для скрининга анти-EGFR соединений. Впервые доказана высокая селективность Gol1 к EGFRvIII: на клетках G01/EGFRvIII его сигнал в 4,2 раза превышал сигнал специфических антител, в то время как исходный аптамер U2 был предпочтителен к EGFR дикого типа. Продемонстрировано, что антипролиферативная и антимиграционная активность Gol1 коррелирует с уровнем экспрессии EGFRvIII и достигает 40% подавления пролиферации и 85% подавления миграции в высокочувствительных культурах, при этом аптамер не токсичен для нормальных клеток. С помощью RNA-seq впервые выявлено, что блокирование EGFRvIII переключает транскрипционную программу клеток глиобластомы с пролиферативной на нейрогенную дифференцировку (активация *NOTCH3*, *PTN*, *NGF*, *TXNIP*; подавление *CCND1*, *BCL2*, *SGK1* и факторов альтернативного сплайсинга). В трансгенных клетках G01/EGFRvIII Gol1, в отличие от U2, подавлял экспрессию ключевых генов выживаемости *PI3K* и *AKT3*. Установлен механизм интернализации – клатрин-опосредованный эндоцитоз. Наконец, впервые на ортотопической модели глиобластомы 101/8 у крыс доказано, что Gol1 преодолевает гематоэнцефалический барьер, селективно накапливается в опухолевой ткани (включая

инвазивные клетки) и визуализируется методами флуоресцентной микроскопии и ПЭТ-КТ. Полученные результаты имеют высокую научную новизну.

Теоретическая и научно-практическая значимость полученных результатов

Теоретическая значимость работы заключается в раскрытии ранее неизвестных молекулярно-физиологических механизмов, через которые EGFRvIII регулирует пролиферацию и миграцию клеток глиобластомы, включая подавление нейрогенной дифференцировки и активацию программ выживания. Практическая значимость состоит в создании прототипа тераностического агента – аптамера Gol1 – который может быть использован для таргетной доставки цитостатиков, радиоизотопов или в качестве самостоятельного ингибитора. Разработанные трансгенные клеточные модели могут служить платформой для скрининга других противоопухолевых соединений. Продемонстрированная способность Gol1 визуализировать опухоль методом ПЭТ-КТ открывает перспективы для клинической диагностики EGFRvIII-позитивных глиобластом.

Степень достоверности результатов исследований, положений и заключения

Достоверность результатов обеспечивается использованием современных и взаимодополняющих методов (компьютерное моделирование, молекулярная биология, клеточные технологии, эксперименты *in vivo*, ПЭТ-КТ). Все ключевые выводы подтверждены статистически (ANOVA, post-hoc тесты, коррекция на множественные сравнения). Работа выполнена на достаточном объёме биологических повторностей. Результаты опубликованы в 5 статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в Scopus и Web of Science, и прошли апробацию на нескольких всероссийских и международных конференциях.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

Материалы диссертационного исследования Дзариевой Ф.М. опубликованы в 5 научных статьях в журналах, рекомендованных ВАК и индексируемых международными базами данных научного цитирования Scopus и Web of Science Core Collection, входящих в «белый список». Все результаты и положения, имеющиеся в диссертации, отражены в опубликованных работах, в т.ч. в 7 тезисах докладов.

Структура и содержание работы

Диссертация изложена на 243 страницах машинописного текста и содержит 60 иллюстраций, 17 таблиц. Диссертация состоит из следующих разделов: введение, список сокращений, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, выводы, список публикаций по теме диссертации, ограничения работы, благодарности, список использованной литературы. Работа построена по общепринятой структуре, оформлена опрятно и имеет минимальные опечатки и недочеты в плане орфографии и стиля. Список литературы содержит 222 ссылки на первоисточники.

Замечания и вопросы по диссертации

Диссертация представляет собой целостное, логически выстроенное исследование. Объём экспериментального материала значителен, иллюстрации информативны, выводы

обоснованы. Особого внимания заслуживает удачное сочетание биоинформатического дизайна с всесторонней функциональной характеристикой аптамера *in vitro* и *in vivo*.

Вместе с тем можно сделать следующие замечания:

1. На некоторых изображениях, полученных с использованием конфокального микроскопа выбраны не вполне оптимальные настройки динамического диапазона, что приводит к урате некоторой морфологической информации. На некоторых рисунках отсутствуют или плохо читаются масштабные отрезки.

2. Часть рисунков представлена на английском языке, поскольку текст написан, и защита предполагается на русском языке было бы желательно использовать русский язык и на рисунках.

Указанные замечания не носят принципиального характера и не снижают общей высокой оценки работы.

Вопросы для дискуссии

1. Селективность Gol1 к EGFRvIII доказана методом конкурентной аптаиммуноцитохимии, а также анализом накопления на клетках с разным уровнем экспрессии рецептора. Проводились ли прямые измерения константы диссоциации (Kd) аптамера Gol1 к очищенным белкам EGFRwt и EGFRvIII? Для исходного U2 такая характеристика в литературе имеется (Kd ~20 нМ), ссылка 160.

2. В работе обнаружен требующий объяснения феномен: аптамер U2, являющийся преимущественным лигандом EGFRwt, в культуре Bl вызывает не только умеренное подавление пролиферации, но и значительную стимуляцию миграции (на 67%). Автор интерпретирует это как проявление феномена «go or grow». Однако молекулярный механизм данного эффекта именно при ингибировании EGFRwt остается нераскрытым. Имеет ли место U2-опосредованная компенсаторная активация другие тирозинкиназных рецепторов (PDGFRβ, c-Met, AXL), способных стимулировать миграционную программу клеточных линий?

3. Транскриптомный анализ выявил появление некоторых нейрональных маркеров в клетках при обработке Gol1. Была ли оценена экспрессия ранних (βIII-тубулин) и поздних (NeuN, синапсины) нейронных маркеров на уровне белка? Может ли трансформация глиобластомы в «нейробластому» или в нейроны являться одним из механизмов остановки пролиферации клеток?

Заключение

Диссертация Дзариевой Фатимы Мухарбековны является самостоятельной, завершённой научно-квалификационной работой, в которой содержится решение актуальной задачи – разработка селективного ДНК-аптамера к EGFRvIII и раскрытие физиологических механизмов его противоопухолевого действия. По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости работа полностью соответствует требованиям п. 9–14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор

заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.5 – «Физиология человека и животных».

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник кафедры
высшей нервной деятельности
биологического факультета
Московского государственного
университета имени М.В. Ломоносова

Мойсенович
Анастасия Михайловна

1.9.26

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Адрес: 119991, Российская Федерация, г. Москва, Ленинские горы, д. 1.

Телефон: +7 (495) 939-10-00

Email: info@rector.msu.ru, сайт организации: https://msu.ru/

Заместитель декана
биологического факультета МГУ,
профессор

А.М. Рубцов