

**«УТВЕРЖДАЮ»**

И.о. генерального директора  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
«Федеральный научно-клинический центр  
физико-химической медицины  
Федерального медико-биологического агентства»

Член-корр. РАН, проф., д.б.н.

М.А. Лагарькова

18.05.2022 г.



## **ОТЗЫВ**

**Федерального государственного бюджетного учреждения “Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства” на диссертацию А.М. Оглоблиной “Мультитаргетные эффекты G4-аптамеров и их противоопухолевая активность *in vitro*”, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6 – Онкология, лучевая терапия.**

### **Актуальность темы диссертационного исследования**

Актуальность темы диссертации определяется необходимостью поиска новых стратегий терапии онкологических заболеваний. Для снижения риска развития резистентности опухоли и повышения общей эффективности лечения целесообразно использование мультитаргетных агентов, а большинство применяемых в таргетной терапии препаратов на основе антител затрагивает единичные мишени. В свете возможного введения аптамеров в клиническую практику в качестве альтернативы антителам проверка их плейотропного действия важна и своевременна. Клинические испытания известных аптамеров с противоопухолевой активностью, прежде всего AS1411, хотя и были приостановлены, дали достаточно обнадеживающие результаты. Выбор гуанин-богатых аптамеров, формирующих G4-структуры, для проверки плейотропного

эффекта вполне рационален и оправдан: он опирается на данные о множественных взаимодействиях характерных типов геномных G4.

### **Практическая значимость результатов**

Практическая значимость результатов исследования напрямую вытекает из актуальности темы. Доказанный Анной Максимовой плейотропный эффект G4-аптамеров создает задел для разработки стратегии мультитаргетной терапии, направленной на приостановку пролиферации опухолевых клеток по нескольким механизмам. В частности, установлено одновременное действие аптамеров на различные элементы контролирующих пролиферативный цикл сигнальных путей. Способствующая индукции апоптоза ингибиторная активность в отношении транскрипционного фактора STAT3 вкупе с блокированием топоизомеразы, объясняющим арест репликации, были выявлены для аптамеров, которые были изначально отбирались к иным мишениям (SP1, нуклеолин и др.). Этот результат позволяет сформировать адекватное представление о противоопухолевой активности известных аптамеров, а итоги анализа связи структура-активность применимы в конструировании новых терапевтических агентов с плейотропным действием.

### **Научная значимость исследования**

В диссертации сформулированы положения, имеющие фундаментальную научную ценность. Среди них стоит отметить концепцию кластерной регуляции экспрессии генов с участием G4 и G4-распознающих белков. В поддержку этой концепции приведены результаты биоинформационического анализа, который выявил наличие в геноме человека множественных однотипных мотивов G4 в промоторных областях. На примере модельных последовательностей, соответствующих одному из таких характерных мотивов, подтверждены квадруплексный фолдинг и взаимодействие с регуляторными белковыми факторами. Установлено, что однотипные мотивы встречаются в промоторах десятков генов. Постулировать их идентичное влияние на транскрипцию было бы преждевременно ввиду различных фланкирующих последовательностей и локальных особенностей эпигенетического

профиля. Однако, по крайней мере для части генов под промоторами с типовыми G4 стоит ожидать согласованной (клластерной) регуляции. Эта клластерная регуляция, по-видимому, реализуется через аддитивные эффекты от нескольких G4-узнающих транскрипционных факторов (включая STAT3, SP1 и др.), их синергетическое действие или, напротив, конкуренцию. Такой множественный эффект эндогенных (геномных) G4 согласуется с гипотезой плейотропного эффекта экзогенных G4 (аптамеров).

### **Новизна и обоснованность выводов**

Наличие множеств однотипных квадруплексных мотивов в геномной ДНК косвенно обсуждалось и ранее, однако тезис о клластерной регуляции генной экспрессии в явном виде впервые сформулирован Анной Максимовной. Плейотропные эффекты аптамеров к белкам-мишеням таргетной противоопухолевой терапии прежде не исследовали, и сама идея о возможной кросс-реактивности в их ряду является новаторской. Включение в выборку аптамеров типовых геномных квадруплексов (G4-TGT, G4-CCC) и рациональная модификация известного апратамера к нуклеолину AS1411 (As-GGG) обеспечили дополнительную новизну. Расширение выборки оказалось оправданным – оно позволило провести полноценный анализ связи структура-активность. Более того, типовые геномные G4 (главным образом, G4-TGT) и оптимизированный вариант AS1411 не уступали аптамерам из основной выборки в способности подавлять рост клеток линии рака молочной железы при отсутствии выраженной токсичности в отношении клеток условно-нормальной линии.

### **Достоверность результатов и сформулированных положений**

Все выносимые на защиту положения подкреплены большим экспериментальным материалом. Биоинформационический анализ проведен с использованием простого, но понятного и вполне подходящего алгоритма. Вторичные структуры олигонуклеотидов подтверждены классическими оптическими методами. Проверка ингибиторной активности в отношении транскрипционного фактора STAT3 выполнена с использованием адекватной клеточной модели (на клетках,

трансфицированных плазмидой с репортерным геном под STAT-чувствительным промотором). Ингибиование топоизомеразы показано путем отслеживания влияние аптамера на релаксацию плазмидной ДНК электрофоретическим методом. Подавление репликации в присутствии аптамеров установлено по снижению эффективности включения клетками Н3-тиимицина методом авторадиографии. Влияние аптамеров на метаболическую активность клеток опухолевой линии показано с помощью стандартного МТТ-теста; контрольные эксперименты выполнены с условно-нормальными клетками. Все использованные методы являются надежными и достаточно современными, анализ данных корректен, достоверность выводов не вызывает сомнений.

### **Содержание работы, полнота опубликованных результатов и соответствие автореферата положениям диссертации**

Диссертационная работа имеет традиционную структуру. В разделе “Введение” обоснованы актуальность темы и новизна работы; раскрыта степень разработанности темы и методология исследования. В главе “Обзор литературы” дана общая характеристика G4 и подробно рассмотрено взаимодействие G4 с белками-мишенями таргетной терапии (фосфорилазой SHP2, топоизомеразой I, транскрипционными факторами STAT3 и SP1, сигнальным белком VEGF и нуклеолином). В обзоре грамотно и четко суммированы опубликованные свидетельства роли перечисленных белков-мишеней в онкогенезе, что дает ясное представление о возможных механизмах противоопухолевого действия их блокаторов и ловушек. Глава “Материалы и методы” содержит достаточно подробное описание всех экспериментальных протоколов, хотя порядок подразделов не вполне отвечает методологии исследования.

Результаты и обсуждение разнесены по главам 3 и 4, что действительно упрощает восприятие материала. Третья глава начинается с поиска и характеристики фолдинга наиболее распространенных квадруплексных мотивов в геноме человека. Обнаруженные мотивы согласуются с теми, что ранее в ходе полногеномного анализа выделяли группы Дж. Хуппerta и Ш. Баласубраманиана.

Они соответствуют структурам параллельной топологии с высокой термической стабильностью. Такие мономолекулярные G4 способны складываться даже в условиях конкуренции с В-формой в геноме, и их синтетические аналоги можно применять в качестве экзогенных ловушек на G4-узнающие белки. В завершающем подразделе главы 3 собраны данные по биологическим эффектам экзогенных G4 – выборке известных аптамеров, имеющих перспективы применения в онкотерапии, и синтетических аналогов геномных G4. Биологические эффекты включают ингибирование транскрипционных факторов и сигнальных молекул, повышенная экспрессия которых характерна для опухолевых клеток/ассоциирована с плохим прогнозом; подавление активности топоизомеразы 1; а также общее подавление репликации и метаболической активности активности онкоклеток. В главе 4 выполнен анализ связи активности с конформационными особенностями аптамеров, выявлен наиболее активный тип G4 (параллельные структуры с тремя квартетами). Сопоставлено действие аптамеров на различные мишени, результаты наглядно демонстрируют плейотропный эффект. Все ключевые результаты обобщены в разделе “Выводы”. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. По материалам работы опубликовано 6 статей в изданиях из перечня ВАК, включая высокорейтинговые журналы.

### **Замечания по представленной работе**

- 1) Для более однозначной интерпретации данных по ингибированию внутриклеточных мишеней стоило прокомментировать (в идеале – оценить количественно) internalизацию различных аптамеров клетками. Из протокола на стр. 52 следует, что клетки инкубировали с олигонуклеотидами в отсутствие дополнительных трансфицирующих агентов. Internalизация олигонуклеотидов может существенно зависеть от их конформационных особенностей. Вероятно, в ряду аптамеров она варьируется, и это вносит вклад в IC50.
- 2) Следовало чуть более подробно описать методику выделения сверхспирализованной плазмида, пусть даже это было сделано с

использованием коммерческих наборов. На электрофорограмме, иллюстрирующей релаксацию плазмиды, не хватает маркера длин.

- 3) При описании методологии исследования в диссертации и автореферате упоминается метод вытеснения флуоресцирующего индикатора. Если такой метод и применялся, в диссертацию результаты не вошли.
- 4) Интерпретация кривой плавления на Рис. 15, скорее всего, корректна, но всё же в отсутствие “нижнего плато” стоило повторить эксперимент в буферной системе с пониженным содержанием ионов G4-стабилизирующих металлов.
- 5) В диссертации встречается несколько неудачных выражений (например, в последнем предложении на стр. 32 подразумевался, наверное, конститутивно активный STAT3).

Замечания носят в основном технический характер и не умаляют ценности работы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Анны Максимовны на тему “Мультитаргетные эффекты G4-аптамеров и их противоопухолевая активность *in vitro*” является научно-квалификационной работой, в котором на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение научной задачи установления плейотропного эффекта G4-аптамеров, имеющей существенное значение для развития для онкологии.

Концепция плейотропного эффекта, ставшая краеугольным камнем диссертации, широко обсуждалась последние годы, но именно ее строгое доказательство на терапевтически значимых мишениях и аптамерах должно стать залогом пересмотра стратегий тестирования противоопухолевых G4. Работа подкупает свежестью подхода и безупречной логикой. Все поставленные задачи выполнены, заявленная цель достигнута. Выводы соответствуют поставленным задачам.

По актуальности, научной и практической ценности полученных результатов диссертация соответствует всем требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении

ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 20 марта 2021 года №426), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 3.1.6. Онкология, лучевая терапия.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре отдела клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» «18» мая 2022 года.

Отзыв подготовила:

Заведующая лабораторией искусственного антителогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения “Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства” (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)

Доктор химических наук (03.01.03 – Молекулярная биология)

Варижук Анна Михайловна

18.05.2022

Подпись Варижук А.М. “заверяю”

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

к.б.н. Т.Н. Грибова



18. 05.2022

Адрес: Россия, Москва, 119435, Малая Пироговская, д. 1а

Телефон/факс: +7 (499) 246-4409

E-mail: info@rcpcm.org, niifhm@fmbamail.ru, annavarizhuk@rcpcm.org