

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Государственного научного центра Российской Федерации
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ГНЦ ИБХ РАН),

по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 27.11.2024 г. № 27

о присуждении **Фроловой Анастасии Юрьевне** ученой степени

кандидата химических наук.

Диссертация «Мультифункциональные гибридные структуры для тераностики раковых заболеваний» по специальности 1.4.9. – «Биоорганическая химия» принята к защите 24 сентября 2024 года (протокол заседания №17) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе ГНЦ ИБХ РАН (адрес: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10), и действующим на основании Приказов Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г. и №561 от 03.06.2021 г.

Соискатель **Фролова Анастасия Юрьевна**, 8 марта 1995 года рождения, в 2018 году окончила магистратуру Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «МИРЭА - Российский технологический университет» по направлению подготовки 19.04.01 «Биотехнология». В 2022 году окончила аспирантуру ГНЦ ИБХ РАН по направлению подготовки 04.06.01 Химические науки, профиль: 1.4.9. – «Биоорганическая химия». В настоящий момент работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории молекулярной тераностики отдела иммунологии ГНЦ ИБХ РАН.

Диссертационная работа выполнена в лаборатории молекулярной тераностики отдела иммунологии ГНЦ ИБХ РАН.

Научный руководитель – доктор химических наук Мартынов Владимир Иванович, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной тераностики отдела иммунологии ГНЦ ИБХ РАН.

Официальные оппоненты:

Пометун Анастасия Александровна, доктор химических наук, заведующая лабораторией молекулярной инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, и **Абакумов Максим Артемович**, кандидат химических наук, заведующий лабораторией биомедицинских наноматериалов Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования

«Национальный исследовательский технологический университет «Московский институт стали и сплавов», дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук, в своем *положительном* отзыве, подписанном научным руководителем Института физиологически активных веществ, д.х.н., академиком РАН Бачуриным Сергеем Олеговичем и утвержденном заместителем директора, д.х.н. Золотухиной Екатериной Викторовной, указала, что диссертационная работа Фроловой Анастасии Юрьевны соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539; 26.09.2022 № 1690; 26.01.2023 №101), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия».

Соискатель имеет 13 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 3 работы общим объемом 3 печатных листа в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые Фролова А.Ю. внесла основной вклад, включают:

1. **A.Y. Frolova**, A.A. Pakhomov, D. L. Kakuev, A.S. Sungurova, S.M. Deyev, V.I. Martynov. Cancer cells targeting with genetically engineered constructs based on a pH-dependent membrane insertion peptide and fluorescent protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2022, 612, 141-146.
2. **A.Y. Frolova**, A.A. Pakhomov, D. L. Kakuev, A.S. Sungurova, A.A. Dremina, E.D. Mamontova, S.M. Deyev, V.I. Martynov. Hybrid protein-peptide system for the selective pH-dependent binding and photodynamic ablation of cancer cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2023, 249, 112803.
3. **A.Y. Frolova**, A.A. Pakhomov, S.M. Deyev, V.I. Martynov. Influence of Peptide Linkers on the Functional Properties of Hybrid Structures with Selective pH-Dependent Binding to Cancer Cells. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2024, 50, 1141–1149.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.х.н. **Пометун Анастасии Александровны**. Отзыв **положительный**, содержит следующие замечания и вопросы:

- 1) В разделе 2.5 обзора литературы содержится информация о структуре и других особенностях различных пептидов pHLP. Для более полного восприятия этой информации было бы удобно, чтобы она была представлена в виде таблицы.
- 2) Некоторые рисунки, например, 4 на странице 21 содержат английские надписи. На мой взгляд, стоит делать перевод подписей к рисунку в тексте диссертацию.
- 3) Работа содержит некоторое количество опечаток и неточностей.
- 4) Остается неясным, чем был обусловлен выбор опухолевых клеточных линий, на которых проводили проверку полученных белковых конструкций.
- 5) В разделе 4.4.1. Дизайн конструкций на основе mCherry и пептидов pHLP указано, что в работе использовались линкерные последовательности SGLRSRAE и GACGIERC GS в качестве гибкого и жесткого линкера, соответственно. Чем была обусловлена именно такая последовательность линкеров? Известно, что иногда в составе гибридных ферментов используются линкерные последовательности, содержащие остатки пролина. Можно ли для пептидов и белков в данной работе использовать остатки пролинов в составе жесткого линкера?

Отзыв официального оппонента к.х.н. **Абакумова Максима Артемовича**. Отзыв **положительный**, содержит следующие замечания и вопросы:

- 1) Из текста диссертации и автореферата не ясно, каким образом подтверждалась первичная структура белка, после наработки в штамме *E. Coli*. Было ли проведено секвенирование генов после вставки в плазмиду?
- 2) Не совсем ясна логика перехода от короткого линкера -GS- и более длинного -IEGRCSGS- использованных в работе с EGFP к линкерам, использованных для работы с mCherry. Здесь одновременно менялись два параметра: 1) линкер и 2) белок и не совсем ясно какие выводы можно сделать из данной части работы.
- 3) В случае белка EGFP наблюдается S обратная кривая зависимости эффективности интернализации для белково-пептидных конструкций EGFP-pHLP. Для белково-пептидных конструкций mCherry-ATRAM и mCherry-pHLP наблюдается явные максимумы на кривых зависимостей от pH. С чем может быть связано такое изменение поведения?
- 4) Не совсем верным кажется утверждение, что эффективность встраивания pH-чувствительного пептида зависит от гибкости линкера. С одной стороны наблюдается

тенденция к увеличению связывания от длины линкера -GS-<-IEGRCGS-. В свою очередь -SGLRSRAE-<-GASEEGEEGIEGRCGS-. С другой стороны, утверждается, что ограничение гибкости не позволяет рН чувствительному пептиду связываться с белковой компонентой и увеличивает его способность интернализироваться. По такой логике -GASEEGEEGIEGRCGS- линкер должен показывать самые плохие результаты.

- 5) Последняя фраза перед Заключением выглядит следующим образом: «Таким образом, показано, что получение рН-чувствительных конструкций на основе белков и пептидов рНЛIP, обладающих высокой эффективностью рН-зависимого связывания является нетривиальной задачей, поскольку данное свойство может зависеть от межмолекулярного взаимодействия белкового компонента с рН-чувствительным пептидом, которое зачастую является неочевидным». Диссертантом получен большой массив данных, из которого сделаны важные выводы, которые перечислены в Заключении и Выводах. Не совсем ясен смысл этого абзаца.
- 6) П.4.4.4. представляет результаты исследования олигомеризации гибридных конструкций. Однако никак не объясняется какой смысл имеет этот опыт, чем он важен для диссертации, хороша или плоха эта олигомеризация?
- 7) Не совсем ясно, почему не представлены данные по накоплению конструкций в почках после в/в введения, если это орган с преимущественным накоплением. Объяснение, что белок фильтруется через почки, не совсем корректно, так как в норме количество белка в моче крайне незначительно.
- 8) В диссертации присутствуют опечатки:
 - «4.4.3. Изучение эффективность рН-зависимого связывания гибридных конструкций»,
 - Рисунок 26а mCherry.

Отзыв **ведущей организации**. Отзыв *положительный*, содержит следующие вопросы и замечания:

- 1) В тексте присутствуют опечатки, пунктуационные и стилистические ошибки, однако они не мешают восприятию текста.
- 2) В разделе 3.2.14. главы «Материалы и методы» стоило привести источник использованных в работе клеточных линий.

Отзыв на автореферат **Анисенко Андрея Николаевича** - к.б.н., доцент химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». Отзыв *положительный*, следующие вопросы и замечания:

- 1) Автор в работе использует наряду с пептидом рНЛIP_wt пептид АTRAM, однако не

приводит сравнение характеристик этих двух пептидов, которые бы объяснили причину включения этого пептида в исследование.

2) Эксперименты на животной модели опухолевого процесса в автореферате описаны только для химерного белка, содержащего ATRAM-пептид, но не pHLP_{wt}. Проводились ли такие эксперименты для pHLP_{wt}-конструкций? Если нет, чем обусловлен выбор именно ATRAM-пептида для этих экспериментов.

Отзыв на автореферат **Морозовой Елены Андреевны** - к.х.н., с.н.с лаборатории химической регуляции биокатализа ФГБУН Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Отзыв положительный, содержит следующее замечание:

1) Автореферат не лишен незначительных орфографических опечаток, которые не осложняют восприятие.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их высокой квалификацией в области, близкой к тематике диссертационной работы, связанной с разработкой и изучением гибридных белковых мультимодальных конструкций. Это подтверждается наличием у них значительного количества публикаций в ведущих российских и зарубежных журналах в данной сфере исследований. Большой исследовательский и опыт оппонентов и представителей ведущей организации в тематике, смежной с направлением диссертационной работы, обосновывает объективность оценивания степени научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретической и практической значимости.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований впервые было показано, что на эффективность рН-зависимого связывания с клетками гибридных конструкций на основе белков и пептидов pHLP способен влиять ряд факторов. Показано, что эффективность подобных конструкций может быть снижена за счет влияния пептидов pHLP на фолдирование белкового компонента, также продемонстрирована важность выбора определенных пептидов семейства pHLP и линкерной последовательности, соединяющей белковую и пептидную часть, для получения эффективных рН-чувствительных гибридных конструкций. Установлено, что мечение подобных конструкций гидрофобными низкомолекулярными соединениями может сдвигать рН-зависимый процесс встраивания в клеточную мембрану в сторону более физиологических значений рН. Были предложены новые подходы, позволяющие повысить эффективность гибридных конструкций на основе белков и пептидов pHLP.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что представленные в данной работе результаты значительно расширяют сведения о свойствах гибридных

конструкций на основе белков и пептидов рНЛIP и способствуют определению более подходящих стратегий их применения.

Значение полученных соискателем результатов исследования для **практики** состоит в том, что они могут помочь в определении оптимального дизайна и стратегии действия конструкций на основе белков и пептидов рНЛIP для получения более результативного эффекта от их применения. Разработанные методики по изучению рН-зависимого связывания конструкций такого рода с клеточными культурами могут быть использованы для исследования иных рН-чувствительных агентов.

Достоверность результатов исследований сомнений не вызывает, гарантируется комплексностью работы и воспроизводимостью результатов. Исследования выполнены с использованием современных методов и оборудования. Материал, представленный в работе, опубликован в российских и зарубежных рецензируемых научных журналах, а также представлен на российских и международных конференциях.

Личный вклад соискателя состоит в ведущей роли при выполнении диссертационной работы. Автор принимал активное участие в анализе литературных данных по теме диссертации, разработке цели и задач исследований по теме диссертационной работы, планировании и выполнении всей экспериментальной части работы (получении генетических конструкций, наработке гибридных белков, проведении клеточных, молекулярных и других исследований), а также обработке и анализе полученных данных. Основная роль подтверждается первым авторством в работах, опубликованных по результатам диссертационного исследования. Материалы исследования были представлены диссертантом в виде устных и стендовых докладов на российских и международных школах и конференциях.

Диссертационный совет 21.1.037.01 заключил, что диссертационная работа Фроловой Анастасии Юрьевны является законченной научно-квалификационной работой, которая значительно расширяет знания о свойствах гибридных конструкций на основе белков и пептидов рНЛIP. Работа написана автором самостоятельно, содержит новые научные результаты, по своему содержанию соответствует специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия». Таким образом диссертационная работа Фроловой Анастасии Юрьевны «Мультифункциональные гибридные структуры для тераностики раковых заболеваний», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия», соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335;

02.08.2016 г. № 748; № 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101; 25.01.2024 № 62).

В ходе защиты диссертации соискателю Фроловой А.Ю. были высказаны следующие критические замечания:

1) Основное накопление гибридной конструкции происходит в почках, но почему эти данные не представлены на гистограмме?

2) Был введен цистеин в короткий линкер и шестнадцатичленный линкер. Известно, что при значении рН около 6 происходит протонирование дисульфидной связи. Зачем в состав линкера включали цистеин и наблюдали ли вы спонтанную димеризацию?

3) Используемые пептиды не структурированы при физиологических условиях. Есть ли какая-либо информация о том, что с ними происходит, когда вы присоединяете к ним длинные линкеры, белки, что с ними происходит? Не влияет ли это на структуру пептидов? Становятся ли они структурированными?

Соискатель Фролова А.Ю. ответила на задаваемые в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

1) На этом гистограмме не представлено сигнала по почкам, поскольку данное накопление неспецифично. Оно обусловлено тем, что данные конструкции обладают достаточно маленьким молекулярным весом, ввиду этого подвергаются выведению почками, что характерно и для контрольного белка.

2) Введение цистеина было проведено для возможности дальнейшего мечения гидрофобными и гидрофильными низкомолекулярными метками данных конструкций. Это было необходимо для изучения конъюгатов белков и синтетических меток. Был проведен гель-фильтрационный анализ для всех конструкций и наблюдалась олигомеризация для большинства конструкций вне зависимости от присутствия цистеина в составе линкера. Видимо, сам по себе пептид, являясь трансмембранным доменом бактериородопсина – достаточно гидрофобен и может взаимодействовать сам с собой.

3) Ранее такой информации не существовало, поэтому и началась работа по данной тематике в рамках диссертационной. Имелись сведения всего о двух конструкциях такого рода и подробно их свойства не обсуждались. Были выбраны модели, в которой в качестве белкового компонента был флуоресцентный белок, поскольку мы могли оценить влияние пептида на его упаковку за счет эффективности синтеза хромофора. И в каких-то случаях эта эффективность значительно менялась, в каких-то – нет. По поводу приобретения определенной структуры и формы в ходе получения таких гибридных конструкций такой информации нет, но мы прослеживаем влияние одного домена на другой.

На заседании 27 ноября 2024 г. диссертационный совет принял решение за достижения в области изучения свойств гибридных конструкций на основе белков и пептидов рНЛIP присудить **Фроловой Анастасии Юрьевне** ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 8 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.4.9. – «Биоорганическая химия»), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

27.11.2024 г.

