

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Гапоновой Светланы Константиновны
**«Сиквенс-специфические олигонуклеотид-пептидные конъюгаты и
N-(метансульфонил)фосфорамидные аналоги антисмысловых
олигонуклеотидов как ингибиторы онкогенных миРНК *in vitro* и *in vivo*»**,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.04 - биохимия

МикроРНК (миРНК) — класс некодирующих одноцепочечных РНК, играющих важную роль в регуляции трансляции и деградации матричной РНК. Согласно современным представлениям миРНК могут контролировать экспрессию как минимум половины генов человека. Будучи вовлеченными в регуляцию большого количества генов-мишеней, отвечающих за жизнедеятельность клетки, миРНК необходимы для нормального развития и функционирования организма. Нарушение баланса в экспрессии миРНК приводит к глобальной реорганизации фундаментальных процессов клетки, в том числе способствует развитию онкологических заболеваний. При этом канцерогенез может быть ассоциирован как с повышением экспрессии онкогенных миРНК, так с понижением количества миРНК с онкосупрессорной функцией. Очевидно, что, обладая столь существенной ролью в канцерогенезе, миРНК могут рассматриваться как перспективные диагностические и прогностические маркеры, а также инструменты для направленной регуляции синтеза белков в клетке и мишени для терапии.

Диссертационная работа Гапоновой С.К. посвящена исследованию двух новых классов миРНК-направленных соединений на основе нуклеиновых кислот, (1) олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и (2) модифицированных по рибозофосфатному остову антисмысловых олигонуклеотидов. Разработка новых подходов к терапии онкозаболеваний посредством эффективного снижения уровня онко-значимых миРНК, безусловно, чрезвычайно важна. Таким образом, тема диссертационной работы Гапоновой Светланы Константиновны, несомненно, является актуальной для научно-технического развития в данной области знаний и соответствует тенденциям развития мировой науки.

Структура и объем диссертации

Анализ структуры диссертационной работы Гапоновой С.К. «Сиквенс-специфические олигонуклеотид-пептидные конъюгаты и N-(метансульфонил)фосфорамидные аналоги антисмысловых олигонуклеотидов как ингибиторы онкогенных миРНК *in vitro* и *in vivo*» свидетельствует о том, что она написана в соответствии с традиционным планом и состоит

из введения, обзора литературы, описания использованных в работе методов, результатов собственных исследований и обсуждения этих результатов, а также содержит обобщающее заключение, выводы и список цитируемой литературы, включающий 294 источника. Работа изложена на 170 страницах печатного текста и проиллюстрирована 13 таблицами и 33 рисунками. В конце диссертации приводится приложение в виде таблицы, представляющей литературные данные по эффективности биологического действия миРНК на опухолевые клетках и модели *in vivo*.

«Введение» раскрывает актуальность выбранной темы, включает формулировку целей и задач исследований, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, основные положения, выносимые на защиту, информацию о личном вкладе автора в представленную работу. В этой главе сформулированы принципы сиквенс-специфического подхода к регулированию активности миРНК в клетке, и обозначены нерешенные до данного исследования проблемы.

В главе 1, посвященной обзору литературы по изучаемой проблеме, дано подробное описание биогенеза, механизмов действия и клеточной утилизации миРНК. Подробно и с многочисленными примерами обсуждается регуляторная роль миРНК при онкологических заболеваниях. Во второй части обзора литературы автор разбирает стратегии воздействия на миРНК нуклеиновыми кислотами с целью ингибирования активности онкогенных миРНК или, напротив, восстановления количества онкосупрессорных миРНК в клетке. Последняя часть литературного обзора, посвященная обсуждению препаратов для терапии онкологических заболеваний, обладающих свойством регулировать активность миРНК, представляется чрезвычайно важной для понимания места представляемых диссертантом результатов в системе существующих и разрабатываемых в мире терапевтических средств. Анализ литературы проведен на высоком уровне, свидетельствует о высокой квалификации диссертанта и прекрасно подготавливает читателя к восприятию результатов работы. Обзор литературы производит положительное впечатление еще и тем, что проанализировано и представлено в компактном виде огромное количество информации.

В главе 2 «Экспериментальная часть» приведены методы исследования, используемые в работе. Поражает спектр методов – от классических молекулярно-биологических исследований *in vitro* до работы с культурами клеток и животными. Все методики написаны подробно, с экспериментальными деталями, что предполагает их воспроизведение. В целом, данный раздел отражает высокий экспериментальный уровень работы.

В главе 3 «Результаты и их обсуждение» можно выделить две части, соответствующие цели исследования - изучению биологических свойств двух типов миРНК-направленных

препаратов на основе олигонуклеотидов: олигонуклеотид-пептидных конъюгатов и антисмысловых олигонуклеотидов, содержащих новую N-(метансульфонил)фосфорамидную (μ -) модификацию.

Первая часть посвящена исследованию олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, адресность которых определяется олигонуклеотидной компонентой, а анти-миРНК активность – РНКазной активностью пептидной компоненты. Диссертант последовательно, шаг за шагом проходит все ступени, необходимые для дизайна такого конъюгата: подбор длины адресной компоненты, выбор длины «шпильки», связывающей адресную и пептидную части, исследование гибридизационных свойств и рибонуклеазной активности конъюгата, в том числе в присутствии РНКазы Н. Показано влияние миРНК 21 - направленного конъюгата на пролиферацию, апоптоз и инвазию на клеточных моделях лимфосаркомы и меланомы, а также влияние исследуемого конъюгата на рост лимфосаркомы у мышей.

Дополнительно проведено сравнительное исследование влияния модификации рибозофосфатного остова ($2'$ -ОСН₃ модификация) на гибридизационные свойства и биологическую активность миРНК-направленного конъюгата.

Вторая часть работы посвящена изучению миРНК-направленных олигонуклеотидов, несущих N-(метансульфонил)фосфорамидную модификацию межнуклеотидных связей. Поскольку этот тип модификаций был разработан в ИХБФМ СО РАН недавно, проведена полная характеристика свойств μ -ОНК как антисмысловых агентов в сравнении с немодифицированными ОНК и хорошо и давно охарактеризованными фосфотиоатными аналогами: исследованы их гибридизационные свойства, определена РНКазы Н-активирующая способность, нуклеазоустойчивость. Также проведены исследования биологической анти-миРНК 21 активности на культуре клеток меланомы мыши В16, определены пролиферативный, апоптотический потенциалы μ -ОНК, их влияние на миграционную активность опухолевых клеток. Исследования *in vivo* продемонстрировали биологическую активность μ -ОНК на модели эпидермоидной карциномы человека KB-8-5.

Работу завершает раздел «Заключение», обобщающий все полученные данные. Выводы объективно отражают суть представленных исследований и соответствуют поставленным экспериментальным задачам.

Научная новизна

Впервые предложены для использования в качестве миРНК-направленных соединений два типа новых соединений: олигонуклеотид-пептидные конъюгаты, осуществляющие сиквенс-специфическое расщепление миРНК-мишени в каталитическом режиме, которые действуют синергически с РНКазой Н; и антисмысловые олигонуклеотиды, содержащие

новую N- (метансульфонил)фосфорамидную модификацию всех межнуклеотидных связей. На примере сиквенс-специфического расщепления миРНК-21 в моделях опухоли *in vitro* и *in vivo* показана их способность подавлять пролиферацию и миграцию опухолевых клеток, индуцировать апоптоз, а также обеспечивать многократное снижение скорости опухолевого роста у мышей.

Достоверность и обоснованность результатов

Большой объем экспериментального материала, высокий научно-методический уровень исследования и тщательный анализ полученных данных обеспечивают достоверность полученных данных и обоснованность сделанных выводов.

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и SCOPUS. Результаты работы представлены на 10 российских и международных конференциях.

Содержание и оформление автореферата полностью отражает основные положения диссертации.

В работе нет существенных недостатков. Присутствует небольшое количество редакторских недочетов и опечаток.

В качестве пожелания хотелось бы видеть мотивацию при выборе мишени для действия – миРНК-21- в начале главы «Результаты и их обсуждение», а не в Заключение. Также в Заключение можно было бы провести сравнение двух исследованных типов миРНК-направленных нуклеиновых кислот с точки зрения практического использования, например, обсудить варианты их направленной доставки в опухоль.

Также в работе нет обоснования выбора клеточных культур, используемых в экспериментах по определению биологической активности конъюгата и антисмыслового μ -ОНК, а также отсутствует единообразие такого выбора для экспериментов одного типа. Так, исследование пролиферативного потенциала проводилось на клетках лимфосаркомы (для конъюгата) и меланомы (μ -ОНК), что не позволяет провести прямое сравнение свойств этих соединений.

Высказанные соображения никаким образом не умаляют уровень этой работы.

Полученные автором результаты могут быть использованы в фундаментальных исследованиях во многих научно-исследовательских институтах молекулярно-биологического и медико-биологического направлений, а также иметь практическое применение в разработке новых средств терапии рака.

Заключение

Диссертационная работа Гапоновой Светланы Константиновны «Сиквенс-специфические олигонуклеотид-пептидные конъюгаты и N-(метансульфонил)фосфорамидные аналоги антисмысловых олигонуклеотидов как ингибиторы онкогенных миРНК *in vitro* и *in vivo*», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченным исследованием, которое по своему содержанию, актуальности выбранной темы, научной новизне, степени обоснованности научных положений и выводов, достоверности полученных результатов, их научной и практической значимости в полной мере соответствует требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена в соответствии с положениями №5 и №6 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а ее автор, Гапонова С.К., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия.

доктор биологических наук

29.10.2020

Ажикина Татьяна Леодоровна

Зав. лабораторией регуляторной транскриптомики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН) 117997,
Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
tatazhik@ibch.ru
8 (495) 330-6992

Подпись Ажикиной Т.Л. «заверяю»
Ученый секретарь ФГБУН ИБХ им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
доктор физико-математических наук



Олейников В.А.