



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

до 04.14 № 138-214.1-330

на № _____ от _____

УТВЕРЖДАЮ
Врио Директора Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, академик РАН, профессор
А.Г. Габитов

“ _____ ” 2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН на диссертационную работу Савельевой Анны Валентиновны на тему «Распределение внеклеточных РНК во фракциях плазмы крови человека и влияние нуклеофозмина 1 на проникновение синтетических аналогов таких РНК в клетки млекопитающих», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Внеклеточные РНК и их комплексы - экзосомы, микровезикулы и рибонуклеопротеины - являются медиаторами процессов межклеточного взаимодействия и, в ряде случаев, способствуют развитию заболеваний человека, в том числе росту и метастазированию опухолей. В настоящее время внеклеточные РНК-комплексы рассматривают как источник для поиска новых диагностически-значимых маркеров развития заболеваний, а также как перспективную модель для усовершенствования существующих подходов к таргетной доставке терапевтических средств. Поэтому актуальность темы исследования не вызывает сомнения.

Научная новизна диссертации определяется тем, что в работе впервые проведен сравнительный анализ состава РНК фракций крови здоровых доноров и пациентов с раком легкого, обогащенных внеклеточными комплексами. Кроме того, изучено влияние одного из

компонентов внеклеточных рибонуклеопротеинов – нуклеофозмина 1, на проникновение синтетических аналогов внеклеточных РНК крови в клетки человека.

Диссертационная работа построена по классической схеме и состоит из: введения, обзора литературы, экспериментальной части, раздела, включающего результаты и их обсуждение, выводы и список использованной литературы. Основная часть данных, полученных методом высокопроизводительного секвенирования, вынесена в приложение.

Первая глава диссертации посвящена обзору литературы. В разделе представлены данные о формировании внеклеточных РНК-содержащих комплексов, а также рассмотрены пути их секреции и интернализации клетками-мишенями. Кроме того, особое внимание уделено роли РНК в процессах, участниками которых являются внеклеточные РНК-комплексы. В заключительной части этого раздела представлено основание для проделанной экспериментальной работы. Автором проработан большой объем литературы (270 источников), весомая часть которой относится к работам последних лет.

Во второй главе приведено описание материалов и методов, использованных в диссертационной работе. Стоит отметить, что наряду с классическими методами молекулярной биологии, автором был использован современный метод анализа первичной структуры РНК - высокопроизводительное секвенирование, а также ряд биоинформатических методов, позволяющих проводить анализ полнотранскриптомных данных.

Третья глава посвящена анализу данных, полученных в диссертации. Глава состоит из трех основных разделов.

В первом разделе приведено подробное описание метода, использованного автором для получения фракций крови, обогащенных внеклеточными комплексами. Приведены данные морфологического и иммунохимического анализа полученных комплексов и показано, что осадки плазмы крови человека содержат мембранные частицы диаметром от 30 до 100 нм, с преимущественным вкладом частиц, содержащих поверхностные маркеры тромбоцитов и Т-клеток. Кроме того, данный раздел содержит результаты анализа состава РНК фракций крови здоровых доноров и пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Анализ данных высокопроизводительного секвенирования был разбит автором на два этапа. На первом этапе проведен поиск РНК, которыми обогащены фракции крови. Было установлено, что мембранные частицы плазмы крови, осаждаемые при 160 000 g, обогащены фрагментами малых ядерных РНК, что вынесено в выводы диссертации. Кроме того, в осадках мембранных частиц крови (16 000 и 160 000 g) был выявлен пониженный вклад фрагментов малых ядрышковых РНК. На втором этапе были идентифицированы формы РНК, которые имели схожее относительное содержание в рассматриваемых фракциях крови, а также формы РНК, вклад которых был достоверно изменен во фракциях крови пациентов с НМРЛ.

Во втором разделе представлены результаты анализа распределения кольцевых РНК (кцРНК) – новой формы длинных некодирующих конкурентных эндогенных клеточных транскриптов - в анализируемых фракциях крови и клетках человека. В данных высокопроизводительного секвенирования было выявлено 88 кольцевых транскриптов, из них 8 не были ранее аннотированы в базе данных кольцевых РНК circbase.org. Для 12 форм кцРНК методом ОТ-ПЦР было показано, что в составе мембранных везикул плазмы крови циркулируют интактные кольцевые РНК. Кроме того, установлено, что содержание полноразмерных кольцевых транскриптов во внеклеточных РНК-комплексах выше содержания их мРНК-гомологов. Анализ содержания 12 кцРНК крови в клетках аденокарциномы легких человека A549 и аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 и MDA-MB-231 выявил, что экспрессия кцРНК существенно различается между линиями клеток различного тканевого происхождения.

В третьем разделе главы «Результаты и обсуждение» представлены данные о влиянии рекомбинантного аналога нуклеофозмина 1 на проникновение синтетических аналогов РНК в клетки человека. Была получена генетическая конструкция, экспрессирующая аналог нуклеофозмина 1 (NPM1-His₆) в клетках *E. coli*. Подобраны условия наработки и очистки NPM1-His₆. Установлено, что очищенные препараты аналога нуклеофозмина 1 не проявляют РНКазной активности и не подавляют жизнеспособность клеток человека линии MCF-7. С использованием синтетических аналогов AluY РНК и U24 C/D бокс РНК было показано, что NPM1-His₆ образует прочные комплексы со структурированными РНК (AluY РНК). Кроме того, установлено, что в комплексе с NPM1-His₆ AluY РНК более эффективно накапливается в клетках через 3 часа инкубации.

Полученные в работе результаты о содержании отдельных форм и целых классов регуляторных РНК, в том числе и кольцевых РНК, в составе внеклеточных везикул крови могут быть использованы для установления механизмов, лежащих в основе процессов межклеточного взаимодействия, опосредованных циркулирующими экзосомами и микровезикулами.

В целом диссертационная работа производит впечатление законченного самостоятельного исследования. Основные научные положения и выводы достаточно логичны и аргументированы.

По диссертационному исследованию имеются некоторые вопросы и замечания:

- Не ясно почему в работе для получения фракций крови, обогащенных внеклеточными комплексами, выбран метод последовательного центрифугирования, а не другие современные подходы, основанные на использовании коммерческих реагентов для осаждения экзосом или аффинных сорбентов.

- Из данных, приведенных в разделе диссертации 3.5 «Кольцевые РНК фракций крови I-V человека», не ясно был ли использован референсный транскрипт для нормирования данных ОТ-ПЦР анализа.

- Формулировка п. 5 раздела «Выводы» неоднозначна, поскольку из экспериментальных данных, представленных в разделе 3.6.4 и на рисунке 17А диссертации, не ясно повышает ли NPM1-His₆ эффективность проникновения AluY РНК или увеличивает ее стабильность в клетке.

Перечисленные недочеты и замечания не снижают научной и практической значимости работы. Диссертация Савельевой А. В. представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, в которой решена важная научная задача по анализу распределения клеточных форм РНК в циркулирующих комплексах крови в норме и при НМРЛ. Кроме того, проведен анализ влияния РНК-связывающего белка нуклеофозмина 1 на трансфекцию синтетических РНК в клетки человека. Результаты работы полностью представлены в публикациях по теме диссертации. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Заключение о соответствии диссертации и автореферата, предъявляемым требованиям.

Диссертационная работа в полной мере отвечает требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология, так как в работе решены задачи по:

- сравнительному анализу состава РНК фракций крови человека, обогащенных внеклеточными циркулирующими комплексами, и для каждой фракции приведено детальное описание наборов форм РНК, относительное содержание которых достоверно отличается от остальных фракций, а также наборов форм РНК, имеющих близкий относительный вклад в рассматриваемых фракциях крови;

- оценке влияния рекомбинантного аналога нуклеофозмина 1 человека на эффективность трансфекции синтетических РНК в клетки человека и показано повышение эффективности трансфекции протяженных структурированных РНК.

Автор диссертации, Савельева А. В., заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук.

Отзыв на диссертационную работу Савельевой Анны Валентиновны подготовлен д.х.н., профессором, Шахпароновым Михаилом Ивановичем, обсужден и утвержден на межлабораторном научном семинаре Отдела пептидно-белковых технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) 19 апреля 2017 г., протокол № 8.

заведующий группой мембранных биоэнергетических систем
д.х.н. профессор

Шахпаронов Михаил Иванович

Подпись Шахпаронова М.И. заверяю
Ученый секретарь ИБХ РАН д.ф.-м.наук
В.А.Олейников

117997, г. Москва, ул. Миклухо-Макля, д. 16/10.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФГБУН ИБХ РАН)

Отдел пептидно-белковых технологий, Лаборатория биокатализа,

тел. +7 (495) 727-38-60,

gabibov@mx.ibch.ru

