

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Старосельца Ярослава Юрьевича** «Спонтанная и катализируемая олигонуклеотид-пептидными конъюгатами реакция трансэтерификации РНК», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия»

Актуальность темы исследования.

Разработка агентов, способных специфично взаимодействовать с РНК и за счет этого селективно ингибировать экспрессию определенных генов открывает возможность избирательно влиять на конкретные биохимические процессы, протекающие в организме, а также селективно подавлять экспрессию находящихся в организме чужеродных нуклеиновых кислот с целью ингибирования размножения инфекционных агентов (бактерии, вирусы, микоплазмы и др.). Кроме того, специфичные по отношению к определенным последовательностям РНК реагенты находят широкое применение в качестве инструментов функциональной геномики и диагностики. В основе конструирования этих агентов лежит использование последовательностей нуклеотидов, комплементарных определенным участкам РНК-мишени. Существует несколько вариантов сайт-направленного воздействия на РНК. В первую очередь необходимо упомянуть антисмысловые олигонуклеотиды (АСО) и короткие РНК, действующие по принципу РНК-интерференции. Оба эти варианта реагентов индуцируют расщепление целевой РНК-мишени определенными клеточными нуклеазами. Рибозимы и ДНКзимы сами расщепляют РНК за счет своей особой пространственной структуры, и их можно назвать искусственными рибонуклеазами. Работа Старосельца Я.Ю. посвящена созданию еще одного типа искусственных рибонуклеаз (иРНКазы) – конъюгатам АСО и РНК-расщепляющих конструкций.

Представленные научные результаты, несомненно, вносят большой вклад в понимание молекулярного механизма действия этого нового типа иРНКаз, роли их структурной организации в этом процессе, а сделанные выводы позволяют заложить основы для развития новой стратегии создания терапевтических препаратов, селективность действия которых обеспечивается комплементарными взаимодействиями с РНК-мишенью, а уничтожение РНК достигается за счет ее расщепления самим терапевтическим агентом.

Научная новизна работы.

В работе Старосельца Я.Ю. впервые детально исследована спонтанная реакция трансэтерификации РНК, показано, что наряду с расщеплением РНК может происходить

лигирование продуктов расщепления, приводящее к появлению новых структур РНК, и установлено, что направление и скорость неферментативной рекомбинации молекул РНК определяется пространственной структурой РНК.

Особый интерес представляют результаты, полученные при изучении расщепления РНК под действием олигонуклеотид-пептидными конъюгатами (ОПК) трех типов: линейных, двойных и петлеобразующих. Впервые продемонстрирована возможность сайт-направленного расщепления РНК на модельной тРНК^{Phe} дрожжей такими конъюгатами. Впервые показано расщепление РНК в структуре петле, формируемой при связывании РНК с ОПК, и определена зависимость степени расщепления как от длины и последовательности этой петли, так и от структуры олигонуклеотидной и пептидной частей конъюгата.

Общая характеристика.

Диссертация Старосельца Я.Ю. имеет традиционную структуру, состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Библиография включает 298 источников. Работа изложена на 172 страницах, иллюстрирована 40 рисунками и 14 таблицами. Объем диссертации оптимален для серьезной квалификационной работы. В работе не содержится ничего лишнего, автор четко и по существу описывает и обсуждает полученные экспериментальные данные.

Раздел «Введение» содержит всю необходимую информацию об актуальности темы исследования и степени ее разработанности, о цели и задачах работы, научной новизне, теоретической и практической значимости, методах исследования, достоверности полученных данных. Кроме того, во «Введении» перечислены основные положения, выносимые на защиту, отражены данные по апробации, месту выполнения работы и личному вкладу соискателя, указана связь работы с научными программами.

Обзор литературы строго соответствует теме исследования и исчерпывающе обосновывает ее актуальность. Староселец Я.Ю. начинает с обсуждения общей информации о возможности направленного воздействия на РНК и, в первую очередь, ее направленного расщепления с помощью комплементарных олигонуклеотидов. Далее отдельно описываются различные типы терапевтических олигонуклеотидных конструкций: антисмысловые олигонуклеотиды, РНК, действующие по принципу РНК-интерференции, рибозимы и ДНКзимы, а также системы CRISPR-Cas, способные расщеплять как ДНК, так и РНК. Наиболее подробно рассматриваются в обзоре иРНК на основе конъюгатов АСО и различных РНК-расщепляющих конструкций. Еще один раздел обзора посвящен описанию механизма

расщепления РНК и факторов, влияющих на скорость этого процесса. В конце обзора автор обосновывает необходимость детального исследования металл-независимые иРНКаз, указывая, что их потенциал в качестве терапевтических агентов совершенно не исчерпан. Обзор написан хорошим литературным языком, легко и с интересом читается.

Глава «Экспериментальная часть» содержит данные об использованных в работе Старосельцем Я.Ю. реактивах, олигонуклеотидных праймерах, плазмидных конструкциях. Тщательно описаны традиционные методы молекулярной биологии, такие как электрофорез в денатурирующем ПААГ и в нативных условиях, получение РНК с помощью транскрипции *in vitro*, амплификация фрагментов ДНК с помощью ПЦР. Кроме того, Староселец Я.Ю. подробно описал, как проводилась оценка эффективности и направленности расщепления РНК. Кроме экспериментов *in vitro* были выполнены и эксперименты *in silico* по моделированию структуры пептида [LRLRG]₂ с малеимидным и аминогексильным линкерами. Спектр использованных в работе методических приемов и технологий весьма широк, и все они отлично подходят для решения поставленных в работе задач.

Полученные в ходе работы Старосельца Я.Ю. экспериментальные данные подробно описаны в следующей главе, представляющей собой результаты и их обсуждение и состоящей из двух больших разделов основных подразделов. Первый раздел посвящен анализу процесса рекомбинации РНК, происходящей в результате двух сопряженных реакций трансэтерификации, приводящих сначала к расщеплению РНК, а затем к лигированию продуктов расщепления. Для исследования рекомбинации РНК в работе была использована модельная система, состоящая из двух 96-звенных фрагментов РНК: фрагмента М2 РНК вируса гриппа и фрагмента РНК ВИЧ-1. В условиях, обеспечивающих возможность протекание реакций трансэтерификации, катализируемых ионами Mg^{2+} , показана возможность образования спектра продуктов в результате рекомбинации РНК. Установлено, что наиболее эффективно лигирование происходит в петлях РНК, фланкированных стабильными двуцепочечными участками. На основании полученных результатов диссертантом сделан вывод о том, что реакции трансэтерификации не являются случайными, вторичная и третичная структура РНК направляет их протекание по определенным участкам. При формировании двуцепочечного комплекса, в котором сближены 2',3'-циклофосфат и 5'-гидроксил, возможна реакция лигирования, и она тем более вероятна, чем прочнее комплекс. Такой комплекс может возникнуть спонтанно и, если может существовать длительное время, привести к образованию серии продуктов. Создание такого комплекса можно индуцировать комплементарным олигонуклеотидом-матрицей, что приведет к образованию определенного типа продуктов. Крайне важно, что установление закономерностей протекания

трансэтерификации РНК позволяет предсказать поведение РНК, например, при взаимодействии с РНК-направленными агентами-лекарствами, что открывает возможность выбирать участки РНК-мишени, наиболее подходящие для расщепления.

Второй раздел посвящен исследованию сайт-направленного расщепления модельной РНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами (ОПК) различной структуры. Это основная часть работы Старосельца Я.Ю., в которой получены очень важные и интересные результаты. Так впервые была продемонстрирована возможность количественного сайт-направленного расщепления модельной тРНК^{Phe} под действием различных типов ОПК – линейных, двойных и петлеобразующих, т.е. изменяющих структуру РНК таким образом, что создается гибридный дуплекс РНК/ОПК, в котором цепь РНК формирует петлю. Для каждого типа ОПК Старосельцем Я.Ю. проведен анализ соотношений структура-активность и установлена оптимальная для данного типа структура олигонуклеотидной и пептидной частей. Показано также, что наряду с особенностями, характерными для каждого типа ОПК, все они обладают рядом общих свойств. Так расщепление РНК происходит как по целевому участку, расположенному в непосредственной близости от места локализации пептида, так и по связям, сближенным с ним в пространственной структуре РНК, при чем характер расщепления фосфодиэфирных связей зависит от их расположения: в целевом участке расщепление происходит по связям С-А, А-С и А-Г, а в участках, сближенных с пептидом в пространственной структуре РНК, расщепление происходит по либо по связи Руг-Х, либо по G-Х, в зависимости от вида конъюгата и последовательности пептида. Важным элементом исследования явилось также установление роли конформационной подвижности каталитического пептида, которая обеспечивается наличием глицина в структуре пептида, а также подвижными линкерами в случае двойных ОПК. В работе показано также, что в случае пептида, несодержащего остатка глицина, наличие карбамидной группы на его С-конце существенно повышает эффективность расщепления РНК. Это крайне интересный факт, несомненно, требующий дальнейшего изучения.

Достоверность результатов и обоснованность выводов.

В работе Старосельца Я.Ю. четко определены и обоснованы актуальность исследований, научная новизна, практическая значимость. Основные положения диссертации, выносимые на защиту, нашли отражение в сделанных выводах, отвечающих цели и задачам исследования. Выводы, сделанные в работе на основании анализа полученных результатов, основаны на большом объеме фактического материала. Достоверность положений и выводов подтверждена результатами статистической обработки экспериментальных данных, согласуемых с данными литературы по выбранной

проблематике. Материалы диссертации достаточно полно отражены в 6-ти печатных работ в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и SCOPUS, 3 из 6-ти работ представлены статьями в высокорейтинговых международных журналах. В 2-х из 3-х статей Староселец Я.Ю. является первым автором. В дополнение к этому материалы диссертации были доложены на 5 всероссийских и международных конференциях, тезисы докладов опубликованы; в том числе тезисы 3-х докладов опубликованы в дополнении к престижному международному журналу *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*.

Значимость работы.

В работе Старосельца Я.Ю. подробно исследована реакция трансэтерификации РНК, протекающая по механизму нуклеофильного замещения SN2 в результате атаки атома кислорода в 2'-положении рибозы на смежный атом фосфора. Данная реакция имеет огромное биологическое значение, обеспечивая возможность расщепления и лигирования РНК в процессе сплайсинга, рекомбинации вирусных геномов, рекомбинации РНК в пребиотических условиях. Особую важность имеют результаты исследования реакции трансэтерификации, катализируемой иРНКазми направленного действия – олигонуклеотид-пептидными конъюгатами (ОПК), в ходе которого выявлены общие закономерности протекания данной реакции и ее зависимость от вторичной и третичной структуры РНК. Полученные в рамках диссертационной работы Старосельца Я.Ю. данные могут быть использованы в биохимии и молекулярной биологии создания эффективных инструментов направленного расщепления РНК. В дальнейшем на базе полученных результатов могут быть сконструированы терапевтические ОПК, направленных на биологически значимые РНК для их инактивации в культурах клеток и *in vivo*. При переходе от модельных ОПК к ОПК, действующим в клетке на РНК-мишени, ассоциированные с каким-либо паталогическим процессом, необходимо будет использовать устойчивые к нуклеазам аналоги олигонуклеотидов в качестве РНК-узнающего домена. В случае протяженных РНК-мишеней, формирующих сложную вторичную и третичную структуры, результаты работы Старосельца Я.Ю. позволят сделать оптимальный выбор «слабых» сайтов – участков, подвергающихся расщеплению в наибольшей степени.

Замечания и предложения.

По содержанию и оформлению диссертации принципиальных замечаний нет. Тем не менее, несколько моментов вызывают вопросы или замечания. Прежде всего, необходимо отметить некоторую несогласованность положений автореферата и диссертации. Так в автореферате на стр. 1 указано, что к настоящему моменту существуют четыре медицинских

препарата, одобренных FDA, действующих по принципу антисмысловых олигонуклеотидов, а также два одобренных FDA препарата на основе siРНК, а в обзоре литературы в диссертации сказано, что таких препаратов 5 для антисмысловых олигонуклеотидов и один для siРНК. Второе несоответствие касается характера расщепления РНК под действием ОПК: в одних местах говорится, что расщепление по целевому участку происходит по любым связям, а в других - по связям С-А, А-С и А-Г, т.е. по 3-м из 16-ти возможных.

Некоторые положения диссертации недостаточно подробно объяснены. Так, например, в заключении к первому разделу работы говорится, что «Реакции трансэтерификации не являются случайными, вторичная и третичная структура РНК направляет их протекание по определенным участкам». При этом не объясняется, что имеется в виду под этими «определенными участками». Непонятно, почему при дизайне петлеобразующих ОПК диссертант изменял не только способ присоединения пептида к олигонуклеотиду, но и использовал для двух семейств ОПК разные пептиды: в семействе А пептид [LR]4G-COOH, который давал не более 24% расщепления РНК в случае линейного ОПК, а в семействе Б - [LRLRG]2-COOH, обеспечивающий 100% расщепление РНК в линейном ОПК. При таком дизайне невозможно провести корректное сравнение этих двух семейств.

Не очень понятно замечание диссертанта о направленности расщепления РНК линейными ОПК (автореферат стр. 10, диссертация стр. 97): написано, что «основным сайтом расщепления является фосфодиэфирная связь С63-А, более слабое расщепление наблюдается по связям С61-А и А62-С. Кроме того, расщеплению подвергались две связи, расположенные на расстоянии от целевого участка: U8-А и С72-А, степень расщепления тРНК^{Phe} по этим связям составляла от 20 до 40%.» При этом на соответствующем рисунке полоса, соответствующая расщеплению по С72-А является доминирующей.

В работе присутствует также небольшое количество ошибок, опечаток и неудачных обозначений. Например, вместо обозначения HIV-РНК лучше было бы использовать русский вариант РНК ВИЧ-1. Тем не менее, все указанные моменты не снижают общей положительной оценки диссертационной работы.

Заключение.

Диссертационная работа Старосельца Ярослава Юрьевича «Спонтанная и катализируемая олигонуклеотид-пептидными конъюгатами реакция трансэтерификации РНК», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия», представляет собой завершённое научное исследование, выполненное на высоком уровне, имеющее очевидное научно-практическое

значение и добавляющее новое знание в области сайт-направленного расщепления/лигирования РНК.

Несмотря на некоторые замечания, которые носят дискуссионный и редакционный характер, диссертационная работа Старосельца Я.Ю. по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.04 «биохимия» (биологические науки), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Диссертация оформлена согласно Приложениям № 5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации, Староселец Я.Ю., без сомнения, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 «биохимия» (биологические науки).

15 ноября 2019

Главный научный сотрудник
отдела химии нуклеиновых кислот
Научно-исследовательский институт
физико-химической биологии
им. А.Н. Белозерского МГУ

Доктор химических наук, профессор

 Готтих Марина Борисовна

Адрес: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40
Рабочий телефон: 8(495)9395407
e-mail: gottikh@belozersky.msu.ru

Подпись Готтих Марины Борисовны заверяю:
Директор НИИ физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В. Ломоносова
академик РАН



 В.П. Скулачев