

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

Диссертационная работа Старосельца Я. Ю. посвящена изучению сайт-направленного расщепления РНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами, а также спонтанного расщепления/лигирования РНК, происходящего по механизму трансэтерификации.

Терапевтические подходы, основанные на сайт-направленном расщеплении РНК, представляют собой альтернативу традиционному подходу непосредственного взаимодействия лекарственных средств с белками. На данный момент существует несколько методов селективного расщепления РНК, основанных на действии различных агентов: РНКазы Н в присутствии антисмысловых олигонуклеотидов, siРНК, рибозимов, РНКзы Р в сочетании с антисмысловыми олигонуклеотидами, ДНКзимов и искусственных рибонуклеаз (иРНКаз). Особый класс иРНКаз представлен олигонуклеотид-пептидными конъюгатами. Одной из проблем, с которой приходится сталкиваться при попытке сайт-направленного расщепления РНК, является выбор сайта расщепления. Проблема этого выбора требует выявления общих закономерностей протекания реакции трансэтерификации РНК, анализа зависимости скорости расщепления по определенным сайтам в зависимости от прилегающих нуклеотидов, а также от вторичной и третичной структуры РНК, чему в диссертационной работе Старосельца Я. Ю. уделено особое внимание. Таким образом, работа Старосельца Я.Ю. вписывается в контекст мировых исследований, и ее актуальность не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Старосельца Я. Ю. состоит из традиционных разделов: введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, насчитывающего 298 наименований.

Обзор литературы посвящен главным образом развитию основных методов сайт-направленного расщепления РНК: антисмысловых олигонуклеотидов, siРНК, рибозимов, ДНКзимов, иРНКаз и CRISPR-Cas. Для каждого метода дана характеристика состояния развития на данный момент, оценены перспективы развития. Обрисованы проблемы, как специфические для каждого метода, так и общие для всех методов сайт-направленного расщепления РНК. Отдельная глава посвящена механизму реакции трансэтерификации РНК, за счет которой происходит расщепление РНК. В целом литературный обзор полностью

отвечает поставленным задачам, и замечания к нему носят в основном редакционный характер.

Глава «Экспериментальная часть» содержит описание современных биохимических и физико-химических подходов и методов, использованных в работе. Методы исследования описаны местами даже излишне подробно. Так, вряд ли в кандидатской диссертации имеет смысл описывать абсолютно рутинные и стандартизованные методы наподобие получения компетентных клеток *E. coli* и их трансформации (разд. 2.3.1–2.3.2), выделения плазмид (разд. 2.3.3), электрофореза в полиакриламидном и агарозном геле (разд. 2.3.4–2.3.6) и введения ^{32}P -метки полинуклеотидкиназой (разд. 2.3.18). С другой стороны, раздел 2.3.25 о молекулярном моделировании написан очень кратко и не позволяет понять всех деталей моделирования.

Раздел диссертационной работы «Результаты и обсуждение» (названный автором «Спонтанная и катализируемая олигонуклеотид-пептидными конъюгатами реакция трансэтерификации РНК») разделен на две части. Первая часть посвящена исследованию модельной системы из двух 96-звенных фрагментов РНК. Показано, что в данной системе проходят реакции трансэтерификации в двух направлениях — расщепления и лигирования, причем последовательность этих реакций приводит к формированию достаточно широкого спектра продуктов рекомбинации РНК. В связи с получением множества продуктов в этой части работы ощущается недостаток контролей — поскольку продукты рекомбинации анализировались опосредованно, после ОТ-ПЦР, стоило бы параллельно провести исследование последовательности продуктов, получаемых в тех же условиях при амплификации исходных РНК, что помогло бы оценить точность всего процесса. Автор, однако, признает, что часть редких продуктов может быть артефактами амплификации и далее сосредоточивается на анализе основных групп полученных последовательностей. В работе продемонстрировано, что структура РНК предопределяет формирование долгоживущих комплексов с протяженными двуцепочечными участками, которые обеспечивает специфическое протекание реакции лигирования с образованием группы продуктов, имеющих сходную структуру, но отличающихся последовательностью в точке лигирования. Вторая часть раздела посвящена исследованию катализируемого олигонуклеотид-пептидными конъюгатами расщепления РНК. Для каждого типа конъюгатов — линейных, двойных и петлеобразующих — проведен анализ соотношений структура–активность. Показано, что наряду с особенностями, характерными для каждого типа, все олигонуклеотид-пептидные конъюгаты обладают рядом общих свойств. Так, катализируемая конъюгатами различных видов реакция трансэтерификации протекает как по целевому участку, расположенному в непосредственной близости от места локализации пептида, так и по

связям, сближенным с ним в пространственной структуре РНК. Выявлена важная роль конформационной подвижности каталитического пептида, которая обеспечивается наличием глицина в структуре пептида и протяженными гибкими линкерами. Однако следует высказать замечания к части молекулярной динамики: в настоящее время считается, что при моделировании именно РНК и ее комплексов требуется явно участвующая вода и ионы со специально оптимизированными параметрами, поскольку координированные ионы имеют большое значение для поддержания структуры РНК. Поэтому воспринимать модели, построенные в работе, следует с осторожностью, что, впрочем, делает и сам автор. Также можно отметить, что на многих графиках не приведены значения разброса данных, что затрудняет анализ достоверности различий между разными экспериментами.

В ходе работы соискателем исследовано поведение модельной системы, состоящей из двух 96-звенных фрагментов вирусных РНК и олигонуклеотида-матрицы, в условиях, обеспечивающих возможность протекание спонтанной реакции трансэтерификации. Впервые продемонстрирована возможность количественного сайт-направленного расщепления модельной РНК (тРНК^{Phe} дрожжей) линейными, двойными и петлеобразующими олигонуклеотид-пептидными конъюгатами, направленными к ее участку С61–G65. Показано, что реакция трансэтерификации, катализируемая олигонуклеотид-пептидными конъюгатами, протекает как по целевому участку в непосредственной близости от места локализации пептида, так и по связям, сближенным с ним в пространственной структуре РНК. Интерпретация экспериментальных результатов, предложенная автором, во всех случаях представляется вполне аргументированной.

Диссертация написана правильным русским языком, хотя в некоторых местах встречаются опечатки. Можно выдвинуть несколько замечаний по оформлению работы. Например, автор во многих местах использует обозначение $t_{1/2}$ для характерного времени существования РНК и ее комплексов, в то время как общеприняты для этого обозначения либо τ , либо $t_{1/2}$. Встречаются сокращения как РНКаза, так и РНКза (местами даже в одном предложении). На с. 9 упомянуты «пептиды из чередующихся остатков гуанина и лейцина». На рис. 7 хотелось бы увидеть и реакцию лигирования. В табл. 2 неподготовленному читателю потребуются усилия, чтобы понять, что «ссылки» на самом деле представляют собой номера клинических испытаний в базе данных clinicaltrials.gov. Не пронумерована таблица в разделе 2.1.5, перечисляющая изученные в работе олигонуклеотид-пептидные конъюгаты.

Сделанные замечания не умаляют достоинств работы и не влияют на основные выводы, которые обоснованы и не вызывают сомнения. Работа Старосельца Я. Ю. выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях. Содержание автореферата

соответствует основным положениям диссертации и опубликованных автором работ по данной теме.

Работа Старосельца Я. Ю. является завершенной в целом научно-квалификационной работой, в которой решена задача установления механизмов сайт-направленного расщепления/лигирования РНК, имеющая существенное значение для важнейшего направления биохимии и молекулярной биологии — изучения комплементарно адресованной модификации нуклеиновых кислот.

Таким образом, по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Старосельца Я.Ю. 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 г.

Заведующий лабораторией
геномной и белковой инженерии
Института химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН

Доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН

Жарков Дмитрий Олегович

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, д. 8
Рабочий телефон: 8(383) 363-51-87
e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru

Подпись Жаркова Дмитрия Олеговича заверяю

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН
к.х.н.



Пестряков Павел Ефимович