

## 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»

Открытие новых функций РНК вызвало волну неподдельного интереса к исследованию свойств этого класса биополимеров, поэтому фундаментальный аспект диссертации Старосельца Ярослава Юрьевича, посвященной изучению спонтанной и катализируемой реакции трансэтерификации РНК не вызывает сомнений. Данная реакция играет важную биологическую роль, обеспечивая, например, возможность расщепления РНК в клетке, расщепления и лигирования РНК в процессе сплайсинга, рекомбинации вирусных геномов и др. Важная часть представленной работы связана с созданием новых инструментов избирательного действия – искусственных РНКз олигонуклеотид-пептидной природы, которые характеризуют актуальность и прикладные перспективы исследования.

Отмечая научную новизну представленной работы, в первую очередь, следует подчеркнуть, что показана ключевая роль пространственной структуры РНК в направлении и скорости ее неферментативной рекомбинации. Рекомбинация РНК происходит в результате двух сопряженных реакций трансэтерификации (расщепления, а затем лигирования РНК-фрагментов). Впервые показано, что наиболее эффективно она протекает в различных петлях.

Впервые продемонстрировано сайт-направленное расщепление РНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами (ОПК) различных топологических типов: линейных, двойных и петлеобразующих.

Найдены закономерности направленного расщепления РНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами: показана зависимость степени расщепления РНК-мишени от длины и последовательности петли, формируемой при связывании РНК с ОПК, а также от структуры конъюгата. Показана принципиальная возможность создания на основе ОПК РНК-расщепляющих агентов сайт-направленного действия.

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.

Отдельного внимания заслуживает литературный обзор диссертации, озаглавленный «Направленное расщепление РНК как терапевтический метод», который носит по ширине охвата материала энциклопедический характер, свидетельствует о глубоком понимании автором тенденций в этой области исследования и аргументирует необходимость и перспективность настоящей работы.

Целью диссертации являлось изучение закономерностей протекания спонтанной реакции трансэтерификации РНК и этой реакции, катализируемой олигонуклеотид-пептидными конъюгатами различных типов: линейных, двойных, петлеобразующих. Для этого в работе были рассмотрены три основные задачи.

- Анализ закономерностей протекания спонтанной реакции трансэтерификации в модельной системе двух 96-звенных фрагментов вирусных РНК.
- Анализ реакции трансэтерификации, катализируемой ОПК различных типов и сравнение их способности расщеплять РНК *in vitro*.
- Оценка возможности расщепления ОПК в режиме многооборотной реакции на примере тРНК<sup>Phe</sup>.

Исследование реакции рекомбинации РНК проводилось на двух 96-звенных РНК вирусов (гриппа и HIV) известной структуры. В результате расщепления РНК образуется набор фрагментов, несущих активный 2',3'-циклофосфат.

Важно отметить, что разработанный автором метод анализа позволил среди факторов, влияющих на спектр рекомбинантных продуктов, выявить эффекты, обусловленные присутствием частично комплементарных РНК олигонуклеотидов и исключить влияние 5'-фосфорилированных продуктов реакции. В результате кропотливого анализа была доказана возможность образования широкого набора продуктов рекомбинации РНК. Показано, что наиболее эффективно лигирование происходит в коротких (1-6 н.) петлях, фланкированных стабильными двуцепочечными участками. Основным выводом этой части работы, который носит фундаментальный характер, важный для дальнейшего исследования, состоит в том, что реакции трансэтерификации РНК не являются случайными. Пространственная организация полинуклеотида влияет на их протекание по определенным участкам. При формировании комплекса, в котором сближены 2',3'-циклофосфат и 5'-ОН, возможна

реакция лигирования. На расщепление целевой РНК можно оказать направленное действие комплементарным олигонуклеотидом-матрицей.

Вторая часть работы посвящена исследованию сайт-направленного расщепления модельной РНК олигонуклеотид-пептидными конъюгатами различной структуры.

Диссертантом было проделано подробное исследование для трех видов ОПК – линейных, двойных и петлеобразующих. Убедительно обоснован дизайн олигонуклеотидной части конъюгатов. Для каждого типа ОПК был проведен анализ соотношений структура-активность. Получены данные об эффективности связывания ОПК с РНК (тРНК<sup>Phe</sup>).

Сравнительный анализ свойств ОПК позволил выявить как особенности, так и общие свойства исследуемого типа иРНКз. Оказалось, что катализируемая ОПК 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. Выявлено, что в целевом участке расщепление происходит по любой фосфодиэфирной связи, тогда как по связям, сближенным с пептидом в пространственной структуре происходит расщепление либо со специфичностью P<sub>up</sub>-X, либо G-X, что определяется видом конъюгата, последовательностью пептида.

В ходе исследований выявлена важная роль конформационной подвижности каталитического пептида, которая обеспечивается наличием глицина в структуре пептида и протяженными гибкими линкерами. Впервые для ОПК показана принципиальная возможность расщепления РНК в условиях многооборотной реакции.

Результаты работы, их достоверность и выводы, сделанные на их основе не вызывают сомнений, поскольку опираются на многочисленные экспериментальные данные, полученные с использованием широкого спектра современных методов исследования.

Необходимо подчеркнуть, что в целом настоящая работа представляет серьезный шаг в развитии особого класса искусственных рибонуклеаз направленного действия – олигонуклеотид-пептидных конъюгатов, а также предоставляет новые данные о влиянии вторичной и третичной структуры РНК на протекание спонтанной реакции трансэтерификации. Дальнейшее развитие работы предполагает создание ОПК, направленных на биологически значимые РНК, выбор способов доставки этих ОПК в

клетки, исследование возможности инактивации за счет расщепления РНК в культурах клеток и *in vivo*. При переходе от модельных ОПК к ОПК, действующим в клетке на терапевтически значимые РНК, 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, актуальным будет выбор «слабых» сайтов – участков, подвергающихся расщеплению в наибольшей степени. Именно к таким участкам должны быть направлены создаваемые ОПК. Кроме того, следует учитывать, что ОПК при связывании с РНК-мишенью изменяет ее структуру, индуцируя появление открытых «слабых» участков, выполняя функцию, аналогичную функции ON-матрицы в исследованной в данной работе системе.

Несмотря на общий высокий уровень работы и ее представления, необходимо отметить ряд неточностей и недостатков.

1. Отсутствует информация о характеристиках препаратов ОПК. Таблица на стр.55 не содержит расшифровки обозначений и даже данных о чистоте используемых соединений. Было бы уместно сослаться на соответствующие публикации.
2. В работе была проведена оптимизация структуры каталитической пептидной компоненты ОПК. Остались не вполне ясными принципы дизайна как самой последовательности пептида, так и его способа присоединения, структуры линкера.
3. В работе присутствуют опiski и стилистические небрежности (например, стр. 19, 22, 41).

Диссертационная работа Старосельца Ярослава Юрьевича «Спонтанная и катализируемая олигонуклеотид-пептидными конъюгатами реакция трансэтерификации РНК», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – «биохимия», является завершенным научным исследованием, выполненным на высоком уровне, имеющим 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 полученных результатов и их 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

Руководитель лаборатории искусственного антителогенеза  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
"Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины  
Федерального Медико-биологического Агентства".

Доктор химических наук, профессор  Позмогова Галина Евгеньевна

Адрес: Россия, Москва, 119435, Малая Пироговская, д. 1а


Рабочий телефон: +74992424696

e-mail: pozmge@gmail.com

Подпись Позмоговой Г. Е. заверяю

Ученый секретарь ФНКЦ ФХМ

к.б.н.



Кострюкова Е.С.