

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Чинак Ольги Александровны**
«Структура пептида RL2 и механизм его проникновения в опухолевые клетки
человека»

представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 Молекулярная биология

Диссертационная работа Чинак О. А. посвящена анализу первичной и вторичной структуры и пространственной организации более высокого уровня рекомбинантного пептида RL2 — аналога природного пептида лактапина, а также способность RL2 проникать в клетки человека и служить доставщиком в них молекул ДНК и РНК.

Природный пептид лактапин представляет собой протеолитический фрагмент белка казеина человека, способный индуцировать апоптоз во многих линиях раковых клеток. Его рекомбинантный аналог RL2, содержащий дополнительно 32 аминокислотных остатка на N-конце и гексагистидиновый аффинный пептид на C-конце, показывает аналогичные свойства и стал прототипом биофармацевтического препарата, проходящего в данный момент клинические испытания. Механизм цитотоксического действия лактапина и RL2 до сих пор оставался под вопросом, однако по своей аминокислотной последовательности они напоминают некоторые пептиды, обладающие способностью непосредственно проникать через плазматическую мембрану (cell-penetrating peptides, CPP). С момента открытия первого их представителя в 1988 г. CPP привлекают внимание мирового научного сообщества и с точки зрения интереса к механизмам проникновения, и как потенциальные инструменты для эффективной трансмембранной доставки биомолекул в клетки. Таким образом, актуальность работы Чинак О. А. как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Чинак О. А. состоит из традиционных разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, насчитывающего 202 наименования. Несколько рисунков технического характера оформлены в виде приложения.

Обзор литературы дает достаточно подробную информацию о пептидах CPP, их физико-химических свойствах и вторичной структуре, механизмах проникновения в клетки, функциях и возможностях применения для доставки высокомолекулярных соединений, в первую очередь лекарственных средств, в клетку и в отдельные ее компартменты. Эта часть весьма информативна, хорошо структурирована и значительно облегчает дальнейшее понимание места пептида RL2 в общей картине пептидов CPP. Далее кратко освещены свойства лактапина и его рекомбинантных аналогов, известные на момент начала работы,

что удачно вводит в рассмотрение изучаемый объект и дает обоснование проблематике исследования. В целом литературный обзор отвечает поставленным задачам, однако в свете проапоптотического действия лактапина и RL2 в нем хотелось бы видеть и описание известных механизмов пептид-индуцированного апоптоза.

Глава «Экспериментальная часть» содержит описание материалов, оборудования и современных биохимических, молекулярно-биологических и цитологических методов, использованных в работе. Методы исследования описаны с достаточной степенью детализации, за исключением части, посвященной исследованию RL2 методами ядерного магнитного резонанса. Даже несмотря на то, что этот анализ проводился не самой соискательницей, для оценки достоверности результатов и корректности их интерпретации без необходимости обращения к опубликованным статьям стоило бы привести детали эксперимента. Кроме того, в эту главу стоило бы перенести все иллюстрации из Приложения 1, поскольку они иллюстрируют процесс выделения RL2 и в полной мере соответствуют содержанию разделов 2.2.1–2.2.4.

Раздел диссертационной работы «Результаты и обсуждение» разделен на три части, из которых первая посвящена анализу структуры RL2, вторая — изучению механизма его проникновения в клетки, а третья — исследованию возможности использования RL2 в качестве доставщика в клетки нуклеиновых кислот. В первой части, основываясь на ранее показанной димеризации RL2 в растворе, структура пептида была исследована методами ^1H -ЯМР, масс-спектрометрии, кругового дихроизма, динамического светорассеяния и атомно-силовой микроскопии. На основе этого была предложена модель олигомеризации RL2 в растворе при околофизиологических значениях pH и ионной силы. Далее для изучения проникновения пептида в клетки был синтезирован и охарактеризован флуоресцентно меченый RL2, содержащий в среднем 1 остаток карбокситетраметилпролами на молекулу пептида. Этот конъюгат, в отличие от свободного красителя, был способен накапливаться в клетках. Было исследовано влияние ингибиторов разных путей эндоцитоза на способность RL2 проникать в нормальные и онкотрансформированные клетки человека и зависимость проникновения от наличия сыворотки в среде. В третьей части работы проведено исследование образования комплексов RL2 с плазмидной ДНК, малыми интерферирующими РНК и малыми ядрышковыми РНК, их гидродинамического диаметра и ζ -потенциала, стабильности таких комплексов. Была показана способность плазмид, доставленных с помощью RL2 в клетки человека, поддерживать экспрессию репортерного гена *EGFP* и способность малых РНК, доставленных тем же методом, проявлять свою биологическую активность — подавлять экспрессию репортерного гена и снижать жизнеспособность клеток опухолевого происхождения.

В ходе работы соискательницей показано, что RL2 представляет собой неупорядоченный пептид в водном растворе и частично способен упорядочиваться в неполярном окружении, а в околофизиологических условиях образует олигомерные агрегаты. Выделенные по стандартному протоколу препараты RL2 содержат смесь пептидного димера и мономерного конъюгата RL2 с β -меркаптоэтанолом. Пептид RL2 проникает в клетки человека как по пути эндоцитоза, опосредованного липидными рафтами, так и непосредственно трансмембранным путем, что обосновывает его отнесение к CPP-пептидам. RL2 способен выступать в качестве доставщика ДНК и РНК в клетки человека с сохранением функциональных свойств этих нуклеиновых кислот. Интерпретация экспериментальных результатов, предложенная автором, во всех случаях представляется вполне аргументированной.

К работе можно сделать ряд замечаний, из которых большинство относится к первой, структурной части. В экспериментах ^1H -ЯМР после обработки TSEP детектируются сигналы, приписываемые β -меркаптоэтанолу, конъюгированному с мономером RL2 при выделении белка и отщепившемуся от него после восстановления. В то же время не очевидны никакие изменения спектров в результате восстановления димера, хотя димер в препарате доминирует, а химический сдвиг протонов при атоме $\text{C}\beta$ в цистеине и цистине разный. При сравнении результатов атомно-силовой микроскопии и динамического светорассеяния разница в размерах частиц на порядок (первые десятки нанометров в первом случае и первые сотни во втором) кажется слишком большой, чтобы ее можно было объяснить исключительно изменением ионной оболочки при пробоподготовке. Наконец, учитывая резко возросшее за последние годы качество предсказания структур белков по их последовательности, любопытно было бы посмотреть на результаты такого моделирования: длина RL2 составляет 121 аминокислотный остаток, и в принципе он мог бы образовывать стабильную третичную структуру, или же, напротив, предсказываться как принципиально неупорядоченный. Возможно, это помогло бы в интерпретации результатов первой части работы. На подписях к рис. 37–39 и в соответствующих подразделах главы «Экспериментальная часть» отсутствуют указания на статистические методы, которыми оценивалась указанная на рисунках достоверность различий между группами или точками.

Сделанные замечания не умаляют достоинств работы и не влияют на основные выводы, которые обоснованы и не вызывают сомнения. Работа Чинак О. А. выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованных автором работ по данной теме.

Работа Чинак О. А. является завершенной в целом научно-квалификационной работой, в которой решена задача установления общей пространственной организации пептида RL2 и доказана его способность проникать в клетки и служить трансмембранным доставщиком

нуклеиновых кислот, имеющая существенное значение для дальнейшего практического применения этого пептида в медицине и биотехнологии.

Все вышеизложенное позволяет заключить, что по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости работа полностью соответствует требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН для диссертаций, представленных на соискание ученой степени кандидата наук, 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 в соответствии с Приложениями 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации Чинак Ольга Александровна, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 Молекулярная биология.

Главный научный сотрудник, заведующий лабораторией геномной и белковой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН), доктор биологических наук, доцент, профессор РАН, член-корреспондент РАН

Жарков Дмитрий Олегович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

Адрес: 630090, Новосибирская область, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

Телефон: (383) 363-51-50

Факс: (383) 363-51-53

Эл. адрес: niboch@niboch.nsc.ru

Подпись Жаркова Дмитрия Олеговича заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, к. б. н.



Логашенко Е. Б.

27 августа 2023 г.