

ОТЗЫВ

Официального оппонента о диссертационной работе Чинак Ольги Александровны «Структура пептида RL2 и механизм его проникновения в опухолевые клетки человека», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Диссертационное исследование Чинак Ольги Александровны посвящено исследованию возможности использования рекомбинантного аналога лактапина RL2 для доставки в клетки нуклеиновых кислот. Тема работы является очень актуальной, поскольку разработка эффективных и безопасных методов доставки нуклеиновых кислот в клетки-мишени, включая siРНК, и мяоРНК, ДНК- и мРНК-вакцин, становится все более возрастающей потребностью биомедицины.

Работа Чинак О.А. является продолжением комплекса работ, посвященным исследованию свойств лактапина и его аналогов. Полученные ранее результаты позволяли сделать предположение, что рекомбинантный полипептид RL2 можно отнести к классу CPP (Cell-penetrating peptides) - специфическому классу пептидов, способных с высокой эффективностью проникать через плазматическую мембрану клеток, благодаря особенностям их физико-химических свойств. В последние годы CPP активно исследуются в качестве системы доставки различных белков и нуклеиновых кислот, обеспечивающих преодоление различных барьеров организма и защиту транспортируемых н.к. от гидролитических ферментов. Эффективное проникновение CPP в клетки различных линий, а также их способность доставлять внутрь клеток молекулы различной природы (белки, нуклеиновые кислоты, противоопухолевые препараты и т.д.) делают CPP перспективными молекулами для создания систем доставки лекарственных средств и диагностических молекул.

Краткая характеристика основного содержания диссертации

Работа написана по традиционной схеме, содержит разделы Введение, Обзор литературы, Экспериментальная часть, включающая описание материалов и методы исследования, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы и Приложения. Работа изложена на 135 страницах, включает 41 рисунок, 4 таблицы и приложение с 6 рисунками. Список литературы содержит 202 литературных источника.

В разделе «Введение» в краткой форме изложены актуальность работы, цель и задачи исследования, научная новизна полученных результатов и их практическая значимость, положения, выносимые на защиту и информация о публикации и апробации результатов.

Глава «Обзор литературы» посвящена характеристике CPP. Описывается история открытия CPP, их классификации, механизмы их взаимодействия с клетками эукариот и возможные области применения. В целом, обзор написан хорошо, достаточно информативен, помогает глубже понять суть изучаемых в диссертации вопросов.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание реагентов и методов, использованных автором в работе. Приведено описание большого количества разнообразных методик, что свидетельствует о высокой квалификации экспериментатора.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из 3-х частей, в которых автор приводит описание полученных данных и делает по ним соответствующие заключения.

Представлены данные об исследовании вторичной структуры RL2, механизмах его проникновения в клетки, а также о его способности доставлять в клетки различные нуклеиновые кислоты. Показано, препарат рекомбинантного RL2, полученного с использованием мочевины, представляет собой смесь гомодимера, стабилизированного межмолекулярными дисульфидными связями, и аддукта мономера RL2 с β -меркаптоэтанолом. При физиологической ионной силе RL2 существует в виде крупных частиц с гидродинамическим диаметром до 700 нм.

Автором проведена большая работа по исследованию механизмов механизма проникновения RL2 в клетки человека, выяснен ряд важных закономерностей. Серией экспериментов продемонстрировано, что проникновение RL2 в опухолевые клетки происходит не только по механизму эндоцитоза, но и, возможно, по механизму прямого проникновения через плазматическую мембрану.

Наибольшую значимость представляют данные о способности RL2 доставлять биологически активные молекулы в клетки человека, в том числе плазмидную ДНК, кодирующую ген *gfp*, siРНК и мяоРНК. Автор показал, что все исследованные НК эффективно проникают в клетки человека в виде комплексов с RL2, сохраняя свою функциональную активность. При этом эффективность доставки дцНК в клетки возрастает с увеличением зарядного соотношения комплексов RL2-НК. Суммируя полученные данные, автор делает заключение о том, что рекомбинантный аналог лактапина RL2 может быть отнесен к пептидам CPP (Cell-Penetrating Peptides) и может рассматриваться в качестве средств доставки в клетки биологически активных молекул.

Замечания по диссертационной работе

Не смотря на то, что диссертационная работа Чинак Ольги Александровны выполнена на высоком научном уровне и в ней представлены весомые и значимые

результаты, следует отметить ряд замечаний и вопросов, возникших у оппонента при прочтении диссертации.

1) В литературном обзоре даётся ссылка на статью, в которой показано, что RL2 обладает способностью вызывать апоптотическую гибель опухолевых клеток человека (на примере культуры клеток MCS-7), но не снижает жизнеспособность в отношении здоровых клеток. Поскольку в диссертации все эксперименты по использованию RL2 в качестве средства доставки плазмидной ДНК, siРНК и мяоРНК проводились на разных культурах опухолевых клеток, стоило привести данные по цитотоксической активности RL2 в отношении этих клеток. Без этих данных можно сделать неверные выводы.

2) В ходе очистки рекомбинантного RL2 получается препарат RL2, который является смесью аддукта мономера RL2 с β -меркаптоэтанолом и димера RL2. Эту смесь использовали для исследования вторичной структуры. У димера и мономера вторичные структуры могут отличаться.

ВОПРОС: Представленные спектры кругового дихроизма на рис.12 относятся к мономеру или димеру? Делались ли попытки разделить димерную и мономерную форму RL2 по размеру, например с использованием гель фильтрации на колонках ВЖХ или Superdex 75 в буфере с мочевиной?

3) Возможно ли, что у полипептида RL2, полученного в эукариотических клетках, будет другая вторичная структура и иные свойства? Делались ли попытки получить эукариотический продуцент RL2?

4) В физиологических условиях RL2 представляет собой агрегат в виде крупных частиц, с гидродинамическим диаметром до 700 нм.

ВОПРОС: Каков размер конъюгата этих частиц с родамином? В том случае, если верна гипотеза о механизме прямого проникновения конъюгата в клетку, какой размер пор должен быть у клетки?

5) ВОПРОС: За счёт каких механизмов может происходить значительная компактизация комплексов RL2 с плазмидной ДНК, которая приводит к уменьшению размеров частиц по сравнению с исходными размерами RL2 и плазмидной ДНК?

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования.

Представленная диссертационная работа Чинак О.А. полностью соответствует критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Работа оформлена, согласно

