

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора Института
химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН по научной работе,
к.х.н. Пестряков П. Е.



апреля 2025 г.

В диссертационный совет ПДС 0300.025
при Федеральном государственном автономном
образовательном учреждении высшего образования
«Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»
117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

ОТЗЫВ

**ведущей организации Института химической биологии и
фундаментальной медицины Сибирского Отделения РАН**

на диссертацию Дубовиченко Михаила Вадимовича на тему:

«Многофункциональные терапевтические олигонуклеотиды для улучшения
эффективности и селективности расщепления РНК», представленную к
защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.4. Биохимия.

Диссертация М. В. Дубовиченко посвящена разработке и характеристике бинарных и мультивалентных РНК-расщепляющих ДНКзимов, способных гидролизовать РНК со стабильной вторичной структурой. Технологии каталитических нуклеиновых кислот как потенциальных терапевтических агентов, биосенсоров и биокатализаторов в настоящее время активно развиваются во всем мире, в связи с чем актуальность настоящего исследования не вызывает сомнений.

Работа состоит из традиционных разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, насчитывающего 163 источника. Работа изложена на 125 страницах, проиллюстрирована 48 рисунками, содержит 7 таблиц.

В разделе «Введение» автор обосновывает актуальность изучаемой проблемы и выбор объектов исследования, формулирует основные вопросы, определяющие цель работы, и положения, выносимые на защиту. Цели и задачи работы сформулированы предельно ясно и корректно. В этом разделе автор также приводит весомые аргументы в пользу научной новизны и научно-практической значимости работы.

В главе «Обзор литературы» детально описываются механизмы действия и современные принципы дизайна основных групп терапевтических олигонуклеотидов — интерферирующих РНК, антисмысловых олигонуклеотидов, направляющих РНК для системы CRISPR/Cas и каталитических нуклеиновых кислот. Этим последним уделено особое внимание, поскольку основная часть диссертационной работы посвящена именно каталитическим олигонуклеотидам. Далее следует довольно лаконичное обсуждение вопросов аффинности, специфичности и мультивалентности как свойств молекулярных систем, которое можно было бы заметно улучшить, описывая эти физико-химические явления на количественном уровне вместо аналогий с гекконами и лопухами (с. 29–30), не имеющих отношения к объектам исследований. Завершается глава описанием ряда примеров используемых на практике биологических макромолекул (белков, нуклеиновых кислот) с переключаемой специфичностью. Обзор литературы имеет самостоятельную ценность, дает достаточное представление об объектах исследования, помогает определить место работы в общей картине знаний о терапевтических олигонуклеотидах и позволяет изучать дальнейшие разделы диссертации без привлечения дополнительных источников.

В работе использованы разнообразные современные биохимические методики, включая методы стационарной и предстационарной кинетики и методы расчета параметров фолдинга нуклеиновых кислот. Все использованные экспериментальные методики подробно описаны в разделе «Материалы и методы». Информация, содержащаяся в этом разделе, вполне достаточна для воспроизведения проведенных автором экспериментов. Хотелось бы, однако, чтобы в этом разделе были представлены ссылки на использованные автором онлайн-ресурсы для дизайна олигонуклеотидных конструкций. Кроме того, таблицы 1, 2, 4 и 7 содержат данные о температурах плавления (также см. замечание о таблицах 2 и 5 ниже), и их логичнее было бы вынести в главу «Результаты».

В разделе «Результаты» логично изложены, проиллюстрированы и обсуждены полученные автором результаты. В начале раздела описывается дизайн мультивалентных ДНКзимов, основанный на предсказанной вторичной структуре их РНК-мишеней. Оценивается сравнительная эффективность и специфичность (в терминах автора — селективность) действия ДНКзимов стандартной и мультивалентной конструкции, ее зависимость от стабильности вторичной структуры самих ДНКзимов. Большой интерес представляет изучение кинетики каталитического действия ДНКзимов, однако к этой части есть ряд замечаний, раскрытых ниже. Далее автор переходит к описанию конструкции бивалентных антисмысловых олигонуклеотидов, которые сами по себе не обладают каталитической активностью, однако индуцируют расщепление РНК-мишеней РНКазой H. Наконец, в последней части раздела «Результаты» рассказывается о дизайне аллостерически регулируемых ДНКзимов и ДНК-свитчей, исследуются их эффективность и специфичность. В целом раздел вполне информативен и

богато иллюстрирован, однако в нем хотелось бы видеть больше первичной информации в виде снимков гелей после электрофореза, а не только результаты обсчета. Также, возможно, ряд объемных таблиц, которые в диссертации представлены как панели рисунков (например, на рис. 29, рис. 37, рис. 40–42, рис. 47–48), стоило бы представить именно как таблицы.

В разделе «Заключение» автор вкратце обсуждает преимущества и недостатки бивалентных и мультивалентных ДНКзимов и ДНК-конструкций по сравнению с традиционными конструкциями, узнающими лишь одну последовательность мишени.

В целом можно отметить, что диссертация Дубовиченко М. В. отличается высокой научной новизной, поскольку в ней впервые систематически изучена эффективность и специфичность действия большого числа бивалентных ДНКзимов, ДНК-конструкций и антисмысловых олигонуклеотидов, даны рекомендации по дизайну таких молекул с заданными каталитическими и узнающими свойствами. Работа Дубовиченко М. В. закладывает основу для применения бивалентных и мультивалентных ДНК-конструкций для контроля экспрессии генов, что представляет значительную ценность для молекулярно-биологической лабораторной практики, а впоследствии может быть использовано для генной терапии.

Материалы диссертационной работы апробированы на 11 международных и отечественных конференциях. Основные результаты исследования опубликованы в 7 статьях в рецензируемых журналах, входящих в основные международные системы цитирования.

Сформулированные в диссертации выводы корректны и адекватно отражают полученные результаты. Каждый вывод полностью соответствует поставленным задачам и целям. Содержание диссертации должным образом отражено в автореферате и в опубликованных работах.

К работе можно сделать ряд замечаний:

- 1) В исследованиях были использованы олигонуклеотиды, синтезированные на коммерческой основе, но нигде не упоминается контроль их качества: судя по описанию в разделе «Материалы и методы», их просто растворяли и определяли концентрацию. Единственный приведенный в работе снимок геля после электрофореза (рис. 31) показывает довольно грязный препарат РНК в отрицательном контроле без ДНКзимов.
- 2) Для реакций в условиях одного оборота обычно проводится несколько экспериментов с повышающейся концентрацией фермента для того, чтобы удостовериться, что действительно весь субстрат находится в комплексе. В работе везде использовали только одно соотношение ДНКзим:субстрат. В качестве альтернативы можно независимо определять константу диссоциации комплекса «фермент–субстрат» и затем работать в диапазоне концентраций, заведомо обеспечивающем полное связывание, однако этого сделано не было.

- 3) Не вполне ясны критерии отнесения условий реакции к многооборотным и способ количественной характеристики таких реакций. Характерная для медленно высвобождающих продукт ферментов, к каковым относятся и ДНКзимы, «фаза всплеска» отчетливо видна только для кривых БивДз1-о и Дз2-о на рис. 27, в прочих же случаях экспоненциальная и линейная фазы реакции практически не разделены, и затруднительно говорить о числе оборотов. Что же касается количественного описания, для медленно высвобождающих продукт ферментов, к каковым относятся и ДНКзимы, многооборотная реакция корректно характеризуется тремя параметрами — константой диссоциации комплекса фермент–субстрат, константой скорости превращения субстрата и константой скорости высвобождения продукта реакции. В работе эти параметры не рассчитываются, хотя использованный параметр k_{obs} в описанных условиях реакции приближен к константе скорости превращения субстрата. Использованный параметр TON, судя по его формуле (с. 57), имеет смысл только для линейного накопления продукта, а это условие не выполняется в большинстве случаев, для которых показаны полные кривые зависимости концентрации продукта от времени.
- 4) Столбчатые диаграммы неоднократно называются «гистограммами», что принципиально неверно: гистограмма — это диаграмма распределения частоты наблюдений или плотности вероятности, и ее ось абсцисс носит строго количественный, а не качественный характер.
- 5) Названия таблиц 2 и 5 полностью совпадают: «Температуры плавления цепей ДНК в дцДНК-платформе у двухкомпонентных БивДз (БивДз2-БивДз6)». Поскольку в таблице 5 отсутствуют какие-либо температуры плавления и перечислены олигонуклеотиды с другими кодами, ее название, очевидно, ошибочно.

Сделанные замечания не критичны для корректной интерпретации результатов и не портят общего положительного впечатления от ясно и логично изложенной работы.

Заключение. Диссертационное исследование Дубовиченко Михаила Вадимовича является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи разработки бивалентных и аллостерически регулируемых ДНК-конструкций, способных эффективно и специфично гидролизовать РНК или экспонировать ее для расщепления клеточными рибонуклеазами, имеющей важное значение для молекулярной диагностики и генной терапии. Работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, согласно п.2.2 раздела II Положения о присуждении ученых степеней в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», утвержденного Ученым советом РУДН, протокол № УС-1 от 22.01.2024 г., а её автор

Дубовиченко Михаил Вадимович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Отзыв подготовлен Лабораторией геномной и белковой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук. Отзыв обсужден и одобрен на заседании расширенного семинара Лаборатории геномной и белковой инженерии 2 апреля 2025 г. (протокол № 1).

Председательствующий на заседании:

Заведующий лабораторией геномной и белковой инженерии,
Член-корреспондент РАН, доктор биологических наук,
профессор РАН

Жарков Дмитрий Олегович

7 апреля 2025 года

Подпись Жаркова Д. О. заверяю
ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к. б. н.

Логашенко Е. Б.



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук

630090, г. Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, д. 8

Тел. +7 (383) 363-51-50; +7(383) 363-51-87; факс: +7 (383) 363-51-53

niboch@niboch.nsc.ru <http://www.niboch.nsc.ru/> dzharkov@niboch.nsc.ru