

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

**Официального оппонента, д.б.н., официального оппонента, д.б.н,
главного научного сотрудника, заведующего лабораторией
молекулярной генетики Федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего образования «Московский
физико-технический институт (национальный исследовательский
университет)»**

Манухова Ильи Владимировича

на диссертацию Дубовиченко Михаила Вадимовича на тему:
“Многофункциональные терапевтические олигонуклеотиды для улучшения
эффективности и селективности расщепления РНК”, представленной к
защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.4. Биохимия.

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Дубовиченко Михаила Вадимовича посвящена геноподавляющим конструкциям на основе коротких олигонуклеотидов. В настоящее время подобные агенты набирают широкую популярность ввиду высокой специфичности их действия, поскольку они позволяют манипулировать экспрессией определенных генов, участвующих в протекании патологических процессов. Одной из проблем использования терапевтических олигонуклеотидов является низкое сродство и селективности действия при взаимодействии с мРНК целевых генов в сайтах, сложенных во вторичную структуру.

В качестве современных методов отдельного повышения сродства подразумевается использование модифицированных олигонуклеотидов с внедренными 2'-оксиметильными группами и/или замкнутыми

нуклеиновыми кислотами (LNA). Такие модификации действительно способствуют повышению сродства, но вместе с тем они также повышают толерантность к нуклеотидным заменам и, следовательно, понижается специфичность действия. Другими современными подходами, которыми уже решается проблема сродства и специфичности, является использование программ для дизайна олигонуклеотидов: GeneScript, OptiRNAi, BLOCK-iT, siRNA-Finder, PFRED и т.п. Данные программы рассчитывают пространственную организацию и термодинамические параметры у РНК целевого гена и нацеленных на неё олигонуклеотидных агентов. В этом случае исключаются участки РНК со сложной структурой. Однако, часто возникают ситуации, когда олигонуклеотиды необходимо нацеливать на структурированные участки РНК, где будет давать о себе знать проблема сродства и селективности.

Для решения проблемы сродства и специфичности (в работе указана, как «селективность») взаимодействия олигонуклеотидных агентов с РНК автор предлагает использование многокомпонентных ДНК-конструкций на основе ДНКзимов и антисмысловых олигонуклеотидов (АСО).

В обзоре литературы развернуто описаны виды существующих геноподавляющих агентов (Интерферирующие РНК, АСО, каталитические олигонуклеотиды, комплексы гидовых РНК с нуклеазами Cas), принципы действия каждого из них, и их современное состояние, как технологий. Далее подробно излагаются причины их низкой эффективности, где особое внимание уделяется дилемме аффинности/специфичности. После, обзор переходит к детальному описанию перспективных подходов в качестве возможного решения дилеммы: использование мультивалентных и маркер-зависимых (аллостерических) систем, которые можно внедрить в дизайн ДНК-конструкции на основе терапевтических олигонуклеотидов. Обзор информативен и представляет собой самостоятельную ценность.

Работа выполнялась с применением различных методик для работ с олигонуклеотидами, включающих в себя термодинамический расчет вторичных структур РНК-фрагментов с использованием соответствующих программ, постановка *in vitro* реакций расщепляющих агентов с РНК в условиях избытка первого (однократный оборот) или избытка второго (многократные обороты), визуализация продуктов расщепления РНК с помощью ПААГ, расчет кинетических параметров (числа оборотов, K_{obs} , начальная скорость реакции) и селективность ($F(s)$) РНК-расщепляющих агентов.

Результаты поделены на 3 раздела, каждый из которых посвящен отдельно исследуемым ДНК-конструкциям: бивалентным ДНКзимам (БивДз),

бивалентным АСО (БивАСО) и аллостерическим ДНК-конструкциям. Для каждой конструкции приведены изображения их молекулярного дизайна и вторичных структур фрагментов РНК, на были нацелены конструкции. Используемые фрагменты РНК различались по стабильности вторичной структуры и особое внимание уделено именно результатам, полученным с высоко стабильными фрагментами РНК. Экспериментальным путем проведена систематическая оптимизация дизайнов ДНК-конструкций, в результате которой получены варианты, наиболее эффективно катализирующие расщепление РНК. После чего для конструкций была оценена специфичность путем проверки их чувствительности связывания с РНК при наличии нуклеотидных замен (мисматчей). Для бивалентных конструкций было установлено, что ключевую роль в специфичности действия играет степень связывания между собой двух ДНКзимов в одной конструкции: чем стабильнее связь, тем меньше специфичность и наоборот. БивДз3 продемонстрировал себя как оптимальная конструкция, обеспечивающая одновременно высокое сродство и специфичность связывания со структурированной РНК. Аллостерические конструкции изначально обладали высокой специфичностью, так как образование их активной формы напрямую зависело от присутствия активирующих маркерных фрагментов (использовался фрагмент n-Мус), однако, из-за особенностей своей конструкции, по эффективности связывания с РНК они уступают исходным ДНКзимам, что частично удалось компенсировать внедрением дополнительных РНК-связывающих доменов в состав конструкций. Результаты во всех разделах четко изложены и богато проиллюстрированы в виде графиков и таблиц.

Новизной данного исследования считается сама концепция использования мультивалентных и аллостерических конструкций для решения комплексной проблемы низких сродства и специфичности терапевтических олигонуклеотидов. Таким образом, автором было впервые показано преимущества использования обоих видов конструкций, а также впервые была применена систематическая оптимизация их дизайна.

Значимость/ценность для науки и практики полученных результатов

Результаты диссертационной работы имеют научное и практическое значение, создают основу для точного дизайна интеллектуальных конструкций на основе терапевтических олигонуклеотидов для направленного расщепления РНК целевых генов, при этом данный подход может быть использован для работы с различными известными терапевтическими олигонуклеотидами.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационная работа Дубовиченко Михаила Вадимовича изложена на 125 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы с результатами, включающими в себя 3 раздела, главы «Заключение», выводов, списка сокращений, списка литературы, включающего 163 источника, списка публикаций по теме диссертации и благодарностей. Диссертация иллюстрирована 48 рисунками и содержит 7 таблиц.

Научные положения сформулированы в виде 5 выводов. Основные выводы следуют из результатов исследования и полностью соответствуют цели и задачам исследовательской работы.

Подтверждение опубликования основных результатов диссертации в научной печати

По теме диссертации сделано 17 публикаций, из которых 6 являются статьями, индексируемые международных базах цитирования Scopus и Web of Science, и из них одна рекомендована в перечне публикаций ВАК.

Соответствие содержания автореферата основным положениям диссертации

Содержание автореферата полностью соответствует содержанию и основным положениям диссертации.

Замечания по работе

1. В положениях, выносимых на защиту, хорошо было бы расшифровать БивДз, т.к. их часто читают отдельно от остального текста, а аббревиатура не устоявшаяся.

2. В разделе «Апробация работы» читатель рискует устать читать названия конференций, достаточно наверное было указать число. Если есть такое желание, то написать подробнее про 1-2 ключевых конференции, где удалось донести до всего мира свои результаты.

3. В обзоре литературы не расписываются свои результаты и не даются на них ссылки. Эту главу из обзора следовало удалить, возможно перенести в дискуссию или заключение к диссертации. Раздел про аптамеры можно было бы наоборот расширить.

3. Конструкции не тестировались в условиях клеток, результаты чего существенно бы усилили работу.

4. Есть вопрос, проводилось ли какое-нибудь исследование молекулярной структуры полученных бивалентов?

Заключение. Диссертационное исследование Дубовиченко Михаила Вадимовича “Многофункциональные терапевтические олигонуклеотиды для улучшения эффективности и селективности расщепления РНК” является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится новое решение научной задачи по одновременному увеличению сродства и специфичности связывания терапевтических олигонуклеотидов с целевыми РНК, имеющей важное значение для 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 22.01.2024г., а её автор Дубовиченко Михаил Вадимович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной генетики, Физтех-школа физики и исследований имени Л.Д. Ландау, ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)» (МФТИ)

Манухов Илья Владимирович

Подпись _____ Дата 20 марта 2025 года

Контактные данные:

тел.: +7 (905) 562-29-24 e-mail: manukhovi@mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация: 03.02.07 Генетика

Адрес места работы: 141700, Россия, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер., 9. ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)» (МФТИ).

Подпись доктора биологических наук,
главного научного сотрудника,
заведующего лабораторией молекулярной генетики
Манухова Ильи Владимировича удостоверяю:
Учёный секретарь МФТИ



Евсеев Евгений Григорьевич