

**«УТВЕРЖДАЮ»**  
Врио генерального директора  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
«Федеральный научно-клинический центр  
физико-химической медицины  
Федерального Медико-биологического Агентства»  
Член-корр. РАН, проф., д.б.н.



М.А. Лагарькова

2022 г.

### **ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ**

Федерального государственного бюджетного учреждения "Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства" на диссертационную работу Гольшева Виктора Михайловича **“Развитие подходов для рационального дизайна новых производных нуклеиновых кислот”**, представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 - химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества

Диссертационная работа Виктора Михайловича Гольшева посвящена методам оценки и предсказания характеристик модифицированных олигонуклеотидов, прежде всего – их гибридизационной способности. Это значимый аспект химической физики биополимеров. На примере фосфорилгуанидиновых (ФГ) и глицин-морфолиновых (gM) олигонуклеотидов Виктор Михайлович продемонстрировал возможности предложенных им подходов к анализу и прогнозированию свойств аналогов нуклеиновых кислот. Подходы опираются на традиционные физико-химические методы, но содержат явный элемент новизны, а результаты имеют очевидную научно-практическую ценность. Объект, задачи и методы исследования полностью соответствуют заявленной специальности.

#### **Актуальность диссертационной работы**

При создании генотерапевтических препаратов на основе нуклеиновых кислот (НК) целесообразно использовать модификации НК-остова для повышения устойчивости олигонуклеотидов в биологических средах, их аффинности и специфичности к мишени. В разработке биосенсоров, систем выделения НК и др. востребованы модификации для управления гибридизационной способностью путем варьирования ионной силы или pH

раствора. Под каждую конкретную задачу требуется подобрать оптимальную модификацию. Несмотря на постоянное расширение арсенала НК-аналогов, лишь малая их часть нашла широкое практическое применение. Помимо коммерческой доступности решающим фактором в выборе модификации является ее влияние на гибридизационную способность НК, а при разработке новых НК-аналогов – прогнозируемость гибридизационных свойств. Возможность рассчитать эффект модификации позволит избежать лишних затрат, приблизит исследователей к рациональному *in silico*-дизайну функционально активных НК-производных для терапии. Необходимость развития подходов к оценке и предсказанию гибридизационных свойств НК-аналогов определила высокую актуальность работы Виктора Михайловича.

В ряде случаев экспериментальная проверка эффектов модификаций и определение термодинамических параметров образования дуплексов затруднительны ввиду трудоемкого синтеза/выделения протяженных олигомеров, либо их крайне низкого выхода. Виктор Михайлович нашел оригинальный способ решения данной проблемы, не требующий протяженных модифицированных олигомеров, и основывающийся на анализе тандемных комплексов. Этот подход актуален при тестировании новых НК-миметиков на стадии разработки.

#### **Научная и практическая значимость работы**

Одним из наиболее значимых результатов исследования представляется модель образования тандемных комплексов коротких олигонуклеотидных аналогов с мишенью, позволяющая оценить термодинамические параметры формирования комплексов, а также сопоставить вклады энтальпии связывания и кооперативных контактов на стыке коротких олигомеров. Модель имеет ограничения (является аналогом модели двух состояний, т.е. не учитывает вероятность частично некорректной сборки и не допускает интермедиатов). Тем не менее, она незаменима в исследовании НК-миметиков, которые не удается получить в виде протяженных олигомеров.

Вторым ключевым результатом исследования видится подход к предсказанию термической стабильности модифицированных дуплексов, успешно реализованный для ФГ-олигонуклеотидов. Виктор Михайлович взял за основу широко применяемую для прогнозирования термостабильности дуплексов нативных НК модель ближайших соседей (БС). Было рассмотрено два варианта ее адаптации для модифицированных олигонуклеотидов, оба показали хорошую сходимость с экспериментальными данными. Адаптированные модели требуют дальнейшей верификации, но их значимость для рутинного

применения ФГ-олигонуклеотидов в молекулярно-биологических исследованиях трудно переоценить.

Стоит отметить, что получение адаптированных моделей потребовало колоссальной предварительной работы. Была подтверждена, хоть и косвенными методами, применимость модели двух состояний для описания плавления/формирования дуплексов с ФГ-олигомерами. Поправки и инкременты, введенные в исходную модель БС, базируются на детальном исследовании влияния ФГ-модификации на термостабильность дуплексов различного состава при различной ионной силе. Были установлены принципиальные различия влияния ионной силы на нативные и модифицированные дуплексы; с помощью молекулярного моделирования объяснена природа этих эффектов. Результаты анализа геометрии и термодинамических параметров образования дуплексов в различных системах имеют научную ценность. В совокупности они дают комплексное представление о преимуществах и недостатках ФГ-модификации НК.

В теории термодинамические параметры образования нативных или модифицированных дуплексов могут быть рассчитаны и без использования БС-модели, а именно путем анализа траекторий их молекулярной динамики (МД). Подход на основе симуляции МД оправдан при отсутствии экспериментальной базы, необходимой для БС-модели. Ограничения подхода, по-видимому, связаны с несовершенством предложенных для НК силовых полей, необходимостью их корректировки для НК-аналогов, сложностью учета энтропийной составляющей и т.д. Виктором Михайловичем продемонстрирована принципиальная возможность расчета параметров образования дуплексов по данным МД с применением известных методов. Ему удалось достаточно точно предсказать энтальпийный вклад в энергию формирования дуплекса. Лучшую сходимость с экспериментальными данными показал метод молекулярной механики в приближении обобщенной модели Борна. Эти результаты отражают необходимость и целесообразность дальнейшего совершенствования силовых полей и методов анализа МД-траекторий.

Обобщая, можно констатировать, что все разработанные подходы к анализу гибридизационных свойств были успешно реализованы – в основном, на ФГ-олигомерах. На протяженных gM-олигомерах были отмечены проблемы с растворимостью и не наблюдалось эффективной гибридизации с мишенью. По этой причине для gM-модификации особенно актуальной оказалась модель тандемных комплексов. Результаты работы наглядно демонстрируют преимущества ФГ-олигонуклеотидов перед gM, а полученные характеристики двух классов модифицированных олигонуклеотидов могут служить

референсными данными при выборе модификаций НК для решения задач молекулярной биологии и медицинской химии.

### **Новизна полученных результатов**

Все значимые результаты получены впервые. Выполнен комплексный анализ гибридизации ФГ- и gM-олигомеров с ДНК/РНК-мишенями оптическими методами в растворах различной ионной силы и рН, что представляет особый интерес для незаряженных (ФГ) и частично заряженных (gM) НК-аналогов. Впервые установлено влияние ФГ- и gM-модификаций на геометрию дуплексов методом молекулярного моделирования. Предложена первая модель для расчета термодинамических параметров формирования дуплексов с ФГ-олигомерами. Алгоритм анализа может быть легко транспонирован на другие НК-миметики. Показана возможность предсказания термодинамических параметров по данным МД. Принципиальной новизной отличается подход к расчету гибридизационных параметров с использованием коротких олигомеров и модели тандемных комплексов.

### **Достоверность результатов и обоснованность выводов**

Достоверность ключевых результатов не вызывает сомнений. Все выводы и положения, выносимые на защиту, обоснованы и подкреплены экспериментальными данными.

Сильная сторона работы В.М. Гольшева – системный подход с детальной проработкой всех аспектов. В качестве иллюстрации стоит привести несколько конкретных примеров. Показательным является раздел, посвященный определению концентраций модифицированных олигонуклеотидов. К этому вопросу молекулярные биологи и биохимики нередко подходят формально и по умолчанию используют приемы, отработанные на нативных НК: оценивают концентрацию спектрофотометрическим методом по оптической плотности при комнатной температуре с поправкой на гипохромный эффект из-за частичного стекинга оснований даже в одноцепочечном олигомере. В.М. Гольшевым показано, что гипохромный эффект ФГ-олигомеров отличен от такового для нативных олигонуклеотидов. При аппроксимации экспериментальных кривых плавления дуплексов теоретическими точное определение концентраций цепей имеет большое значение для корректного определения термодинамических параметров.

Не менее показателен раздел, посвященный анализу термодинамических параметров связывания и кооперативного контакта в тандемных комплексах. В рамках предложенной модели расчет параметров может быть выполнен различными способами (одновременная аппроксимация нескольких кривых, анализ каждой кривой, анализ зависимости термической

стабильности от концентрации). В диссертации опробованы все три метода, результаты согласуются между собой. Таким образом, В.М. Гольшев на каждом этапе исследования рассматривал все доступные методы и сопоставлял результаты для обоснованного выбора оптимального протокола.

Работа достаточно разнообразна в методическом плане. Используются методы спектрофотометрии, молекулярного моделирования и молекулярной динамики, метод остановленного потока. Такой спектр методов был необходим для всесторонней оценки гибридизационных свойств олигонуклеотидных аналогов. Он позволил сформировать достаточную базу референсных данных для прогнозирования термодинамических параметров ФГ-олигонуклеотидов, хотя дополнительная верификация на расширенной выборке последовательностей не будет лишней. Протоколы всех экспериментов опираются на известные методы и подробно описаны в экспериментальной части. Все использованные в расчетах уравнения и их вывод корректны. Отдельные спорные моменты, касающиеся тандемных комплексов, обсуждаются ниже.

#### **Общая характеристика диссертации и замечания**

Диссертация структурирована традиционно. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, результатов и выводов, списка сокращений и списка литературы. Полный объем диссертации составляет 162 страницы с 53 рисунками и 21 таблицей. Список литературы включает 177 наименований. Введение дает представление о теме исследования, его целях и задачах с обоснованием актуальности и новизны. В обзоре литературы представлен анализ современного состояния исследований в области олигонуклеотидных аналогов. Основное внимание уделено перспективным модификациям олигонуклеотидного остова, расчету термодинамических параметров их гибридизации с НК, а также методам молекулярного моделирования дуплексов. В экспериментальной части представлены протоколы исследований термической стабильности дуплексов оптическими методами, использованные методы молекулярного моделирования и методики расчетов термодинамических параметров. В основном разделе последовательно и четко изложены результаты экспериментов и расчетов, их сравнительный анализ и сопоставление с литературными данными. Итоги работы отражены в разделе "Выводы".

Диссертация производит очень положительное впечатление. Это глубокое исследование, логично выстроенное и прекрасно спланированное. Анализ и интерпретация данных выполнены последовательно, выбор моделей и методов четко аргументирован. В работе решены все поставленные научные задачи, а объем диссертации соответствует

требованиям, предъявляемым к научно-квалификационной работе на соискание степени кандидата наук. Автореферат диссертации соответствует основным положениям диссертации, ее содержанию.

Тем не менее, отдельные спорные моменты содержатся в разделе, посвященном тандемным комплексам:

1) На гомополимерных последовательностях сложно исключить образование комплексов, отличных от представленных на Рис. 6. Обоснование схемы на Рис. 6 строится на принципе кооперативного связывания: присоединение первого короткого олигонуклеотида к протяженной матрице повышает вероятность корректного присоединения последующего за счет дополнительных стекнинг-контактов на стыке олигомеров. Результаты моделирования тандемных комплексов gM-олигомеров с матрицей показывают, что концевые участки олигомеров подвижны, геометрия дуплекса искажена. Возможно, стекнинг-контакты между короткими олигомерами не реализуются, стоило это обсудить в диссертации несколько подробнее.

2) Формирование тандемных комплексов “со сдвигом” (со свисающими фланками и прогалами между короткими олигомерами) также трудно исключить для гомополимерных последовательностей, хотя описание подобной системы неоправданно усложнило бы модель. Вероятно, в будущем для исключения “сдвига регистра” целесообразно было бы использовать вместо гомополимеров (или наряду с ними) матрицы более сложного состава. Такая попытка предпринималась, но для gM-олигомеров гибридизации не наблюдалось. Комментарий о целесообразности и рисках использования последовательностей с тандемными повторами смешанного состава крайне желателен.

3) В обсуждении применимости модели “все или ничего” для описания тандемных комплексов диссертант опирается преимущественно на косвенные методы. Возможно, следовало указать, какие дополнительные методы могут быть использованы в дальнейшем для исключения интермедиатов и проверки стехиометрии комплексов (например, анализ кинетических кривых и Job's plot соответственно).

Финальное замечание касается оформления работы. Стиль изложения не вызывает нареканий, но большое число грамматических и синтаксических ошибок несколько снижают общее впечатление.

Все перечисленные замечания не умаляют общей ценности исследования и не ставят под сомнение ключевые выводы. Диссертационная работа В.М. Голышева является

законченным научно-квалификационным исследованием, посвященным фундаментальным аспектам химической физики – гибридационным свойствам олигонуклеотидных аналогов и термодинамике формирования дуплексов с НК-мишенями.

Работа выполнена на высоком научно-методологическом уровне. Исследование полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 “Положения о присуждении ученых степеней”, утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 в действующей редакции), а автор работы, Гольшев Виктор Михайлович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 - химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества

Отзыв на диссертационную работу обсужден и утвержден на семинаре отдела биофизики ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России (протокол от 04.02.2022).

Отзыв подготовила:

Варижук Анна Михайловна



Доктор химических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология  
Заведующая лабораторией искусственного антителогенеза

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства" (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)

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

Телефон/факс: +7 (499) 246-4409

E-mail: info@rcpcm.org, niifhm@fmbamail.ru, annavarizhuk@rcpcm.org

15.02.2022

Подпись Варижук А.М. заверяю  
Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

к.б.н.



Т.Н. Грибова

15.02.2022