

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Давыдовой Анны Сергеевны**
«Новые моно- и бифункциональные конструкции на основе 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров для детекции гемоглобина человека»
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биорганическая химия

Диссертационная работа Давыдовой А. С. посвящена созданию химически модифицированных белок-связывающих нуклеиновых кислот — РНК-аптамеров — специфично узнающих нормальный и гликированный гемоглобин человека, а также репортерный белок обелин из медузы *Obelia longissima*.

Аптамеры представляют собой РНК- или ДНК-олигонуклеотиды, которые связываются с определенной молекулой-мишенью. Аптамеры обычно получают путем отбора из большого пула случайных последовательностей при связывании с мишенью методом систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX, англ. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment). Этот процесс по сути аналогичен отбору антител при генерации иммунного разнообразия, поэтому в теории возможно получить аптамеры с высоким сродством и специфичностью к любой мишени. Такая возможность делает аптамеры удобными инструментами для биоаналитических и терапевтических приложений, и в мире разработано немало биосенсоров на их основе. В число крайне важных с практической точки зрения аналитов входит гликированный гемоглобин (HbA1c) — форма гемоглобина А, подвергшегося неферментативному гликированию свободными моносахаридами в плазме крови. HbA1c отражает уровень глюкозы в крови и поэтому служит четким биомаркером диабета. Таким образом, работа Давыдовой А. С. вписывается в контекст мировых исследований, и ее актуальность не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Давыдовой А. С. состоит из традиционных разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, насчитывающего 200 наименований. В работе имеются 3 приложения, подробно описывающие использованные автором условия SELEX для разных мишеней.

Обзор литературы дает подробную информацию об аптамерах и системах для детекции биомаркеров на их основе. Освещены общие принципы метода SELEX и дизайна библиотек для него. Обсуждены химические модификации нуклеиновых кислот, используемые для придания аптамерам устойчивости в биологических средах. Значительную часть литературного обзора составляет описание использования аптамеров как сенсоров для разнообразных белковых и низкомолекулярных биомаркеров заболеваний. Описаны также существующие методы детекции HbA1c, не основанные на применении аптамеров. Обзор

завершает краткая информация о фотопротеине обелине, которую, возможно, стоило бы расширить и выделить в отдельный подраздел. В целом литературный обзор полностью отвечает поставленным задачам.

Глава «Материалы и методы» содержит описание современных биохимических методов, использованных в работе. Методы исследования описаны с достаточной степенью детализации, и к этому разделу практически нет замечаний, за исключением того, что стоило бы привести данные о чистоте препаратов белков-мишеней (гемоглобина, HbA1c, обелина), на которые производился отбор аптамеров.

Раздел диссертационной работы «Результаты и обсуждение» (названный автором «Создание новых 2'-F-модифицированных РНК-аптамеров и аналитических конструкций на их основе для детекции гемоглобина человека») разделен на 4 части. В первой из них описан синтез и характеристика комбинаторной ДНК-библиотеки и получение на ее основе РНК-библиотеки, в которой все пиримидиновые звенья модифицированы фтором по положению С2'. Вторая часть работы посвящена получению методом SELEX на основе этой РНК-библиотеки аптамеров, селективно связывающих суммарный гемоглобин человека и гликированный гемоглобин HbA1c. Наиболее удачные из отобранных аптамеров были далее усовершенствованы с использованием подхода рационального дизайна. Была частично охарактеризована вторичная структура этих аптамеров. В третьей части автор использует тот же подход SELEX для получения аптамеров к обелину, который в данной работе используется как репортерный белок. Наконец, в четвертой части на основе полученных ранее в работе аптамеров создана бифункциональная конструкция, в которой обелин непосредственно выступает как репортер для детекции гемоглобина, а аптамер служит одновременно для связывания обоих белков, что позволяет избежать использования антител как посредников при анализе.

В ходе работы соискателем получены и охарактеризованы новые 2'-F-РНК-аптамеры на суммарный гемоглобин человека и гликированный гемоглобин HbA1c, которые могут быть использованы для детекции этих биомаркеров в микропланшетном формате. Исследована вторичная структура трех гемоглобин-связывающих аптамеров и показано, что наиболее вероятно их существование в виде параллельного G-квадруплекса. Впервые получены и охарактеризованы 2'-F-РНК-аптамеры на биоломинесцентный белок обелин и созданы бифункциональные аптамерные конструкции, содержащие гемоглобин-связывающий и обелин-связывающий модули и пригодные для использования в микропланшетном формате. Интерпретация экспериментальных результатов, предложенная автором, во всех случаях представляется вполне аргументированной.

Замечания к работе немногочисленны. Основное из них состоит в ее несколько нелогичной организации. Автор получает аптамеры на гемоглобины и характеризует их, используя обелин как репортер (раздел 3.2.3.1), и лишь затем три из них анализируются в традиционном колориметрическом формате (раздел 3.2.3.1). При этом, например, в паре аптамеров H5t1 и H9t1 максимальный ответ оказывается выше либо для одного, либо для другого в зависимости от типа детекции (ср. рис. 23 и 27). Остается открытым вопрос, насколько изменились бы оценки эффективности и селективности аптамеров, если бы анализ с самого начала проводился в колориметрическом формате, который все же на сегодняшний день гораздо более стандартизован, чем биолюминесцентный формат с обелином как репортером. Понятно, что такая последовательность экспериментов отражает историю развития исследования, легшего в основу диссертационной работы, однако для обоснования использования обелина как основного репортера стоило бы дать информацию из более ранних работ, где этот метод был валидирован. Кроме того, раз уж автором получены аптамеры, узнающие HbA1c, хотелось бы видеть в результатах количественную оценку как селективности, так и специфичности этих сенсоров. В литературном обзоре (таблица 4 и раздел 1.5) обсуждаются практически одни лишь ДНК-аптасенсоры, хотя диссертационная работа посвящена РНК-аптасенсорам. Прочие замечания носят лишь редакционный характер, в целом же диссертация написана хорошим русским языком и тщательно вычитана.

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

Работа Давыдовой А. С. является завершенной в целом научно-квалификационной работой, в которой решена задача создания систем детекции белковых биомаркеров на основе 2'-F-пиримидин-модифицированных РНК-аптамеров, имеющая существенное значение для важнейшего направления биоорганической химии — разработки новых биоаналитических подходов к медицинской диагностике.

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 Давыдова Анна Сергеевна, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Заведующий лабораторией белковой инженерии
Федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего образования
«Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет», доктор биологических
наук, доцент, профессор РАН, член-корреспондент РАН

Жарков Дмитрий Олегович

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ)

Адрес: 630090, Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Телефон: (383) 363-40-00

Факс: (383) 363-42-80

Эл. адрес: rector@nsu.ru

Подпись Жаркова Дмитрия Олеговича заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного
автономного образовательного учреждения высшего
образования «Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет», к. х. н.

Тарабан Е. А.

7 июня 2021 г.

