

## 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 на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биорганическая химия.

Диссертация Давыдовой А. С. посвящена актуальной теме – получению и использованию молекулярных узнающих элементов (МУзЭлей) – аптамеров, на основе 2'-F-пиримидин-модифицированных РНК. В качестве мишени для аптамеров выбран гемоглобин (Hb) и его гликированное производное HbA1c, которое является одним из молекулярных маркеров сахарного диабета.

В литературе описаны аптасенсоры с ДНК-аптамерами для количественного определения гликированного гемоглобина. В данной работе поставлена цель - изучить возможность создания новых аптасенсоров с оптическими методами детекции, которые отличаются простотой и доступностью проведения анализа и совместимы с микропланшетным форматом. В качестве МУзЭлей выбраны 2'-F-пиримидин-модифицированные РНК-аптамеры. При такой постановке цели необходима четкая мотивация выбора 2'-F-РНК.

Для достижения поставленной цели были селектированы три типа 2'-F-Пу-РНК-аптамеров, которые узнают три мишени: два типа гемоглобина Hb, HbA1c и фотопротеин – обелин. Были созданы комбинации аптамеров – ковалентные двухмодульные бифункциональные аптамеры с переключаемой активностью. Показана возможность биолюминесцентной детекции гликированного гемоглобина в суммарном гемоглобине.

Научная новизна работы Давыдовой А.С. не вызывает сомнений. Получение и изучение новых аптамеров к различным мишеням, естественно, сильно опаздывает по сравнению с антителами, репертуар аптамеров довольно ограничен. Использование аптамеров в аптасенсорах требует существенного расширения экспериментальных данных и практики их применения. Работа Давыдовой А.С. вносит свой позитивный вклад в развитие аптамерологии.

Диссертация Давыдовой А.С. имеет классическую структуру, изложена на 142 страницах, содержит 45 рисунков, 14 таблиц и 3 приложения; библиографический список имеет 200 источников.

Оппонент с большим интересом ознакомился с работой Давыдовой А.С.

Обзор литературы «АПТАМЕРЫ КАК УЗНАЮЩИЕ ЭЛЕМЕНТЫ БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ БИОМАРКЕРОВ» кратко описывает получение и применение аптамеров, более подробно рассматривает некоторые примеры аптасенсоров для детекции патологических биомаркеров в крови. Рассмотрены следующие заболевания: злокачественные, нейродегенеративные, стресс-опосредованные, воспалительные, сердечно-сосудистые, и, наконец, сахарный диабет.

Глава «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ» традиционно посвящена описанию эксперимента.

Глава РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ «СОЗДАНИЕ НОВЫХ 2'-F-МОДИФИЦИРОВАННЫХ РНК-АПТАМЕРОВ И АНАЛИТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ НА ИХ ОСНОВЕ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕМОГЛОБИНА ЧЕЛОВЕКА».

Для получения аптамеров использованы современная методология и современные методы, включая высокопроизводительное секвенирование. SELEX аптамеров к гемоглобину человека и его производному HbA1c, иммобилизованным на магнитных частицах, проводился для 87-звенной библиотеки с большим рандомизированным участком в 40 нуклеотидов. На последних 4-5 этапах SELEX использовалась контр-селекция: для Hb – на пустых частицах и частицах, модифицированных альбумином; для HbA1c – на частицах с иммобилизованным Hb. После 10 и 12 раундов селекции, соответственно, было проведено высокопроизводительное секвенирование как для конечной обогащенной фракции, так и для промежуточных раундов селекции.

Аффинность аптамеров к гемоглобинам определяли биолюминесцентным анализом, в котором аптамер был иммобилизован на микропланшете, а количество связанных с аптамером Hb и HbA1c определяли с помощью антител, конъюгированных с фотопротеином – обелином. Интересно отметить, что самый представленный после селекции вариант H1 не связывался с мишенью. Определяемые кажущиеся константы диссоциации (кКд) аптамер-мишень являются концентрационными и имеют достаточно высокие значения, более 100 нМ; в связи с этим возникает вопрос - проводилось ли оценка кКд для данных аптамеров другими методами?



Интересные и необычные данные получены Давыдовой А.С. для спектров КД. Для изучения возможности формирования G-квадруплексов совершенно логично использованы аптамеры, которые содержали 4 блока G. Для контроля, в аптамерах G заменили на U. Фактически наиболее яркие различия наблюдаются только для взаимодействия с тиофлавином T (ThT). Для доказательства наличия G-квадруплексов этого недостаточно, поскольку этот краситель связывается со многими соединениями, включая ДНК и даже белки; правда с разными значениями разгорания флуоресценции и различными константами связывания. Более убедительны были бы данные по титрованию аптамеров ThT, полученную кКд можно было бы сравнить с другими, включая контрольный заведомо G-квадруплексный олигонуклеотид. Даже сравнение интенсивности флуоресценции ThT для контрольного G-квадруплекса и для аптамеров могло бы дать ценную информацию. Кроме того, необходимо учитывать и необычные свойства аптамеров, которые придает им наличие фтор-заместителей.

Несмотря на кажущуюся простоту аптаферментного анализа этот метод нельзя просто скопировать, заменив антитела на аптамеры. Давыдова А.С. умело использовала различные комбинации иммобилизации и детекции и добилась положительного результата при комбинированном варианте.

Чтобы заменить антитела аптамерами для фиксации фотопротеина – обелина проведена селекция 2'-F-РНК-аптамеров; для этого необходимо мотивировать использование именно обелина. Очень интересные данные получены для аптамеров, которые по-разному узнают обелин и его 6His-производное; при этом использован довольно необычный вариант метода детекции комплексов на нитроцеллюлозных фильтрах. Может поэтому были получены такие высокие значения кКд (около мкМ), которые не характерны для типичных аптамеров? Простое сравнение двух методов измерения кКд могло бы проиллюстрировать корректность этого предположения.

И, наконец, была создана оригинальная двухмодульная бифункциональная конструкция из аптамеров для Nb и обелина для биоломинесцентной детекции. Изюминка этой конструкции заключалась в том, что обелин-связывающий модуль переходит в компетентную для связывания конформацию только после связывания Nb со своим модулем. К сожалению, рис. 9 автореферата неудачно иллюстрирует этот красивый подход. Три варианта двухмодульного аптамера позволяли определять суммарный Nb в наномолярном диапазоне. В связи с этим возникает традиционный вопрос: каким образом аптамерный модуль O79t1 с кКд = 1900 нМ обеспечивает комплексообразование с

обелином при низких концентрациях? Не в этом ли кроется ответ на вопрос из предыдущего абзаца?

Несколько разрозненных замечаний.

Нельзя в разделе «Положения, выносимые на защиту» писать только номер аптамера (например, H9t1 в пункте 3 автореферата), не указывая его основных параметров, например, хотя бы размеры.

На рис. 2 и 3 автореферата приведены предполагаемые вторичные структуры аптамеров и вариантов их минимизации; при этом использовалась стандартная программа предсказания от Венского университета (Австрия). Возникает 3 вопроса. Во-первых, использовались ли другие программы моделирования вторичной структуры и если да, то совпадают ли результаты? Во-вторых, сохраняет ли программа варианты вторичных структур после виртуального удаления участков? В-третьих, почему в предполагаемых G4-участках не нарисована квадруплексная структура?

Количество ошибок в диссертации не превышает среднее значение. Следует отметить только стандартную и, к сожалению, уже общепринятую ошибку, которая происходит от англоязычного аналога – использование терминов «последовательность», «участок», «фрагмент» как синонимов. В первом случае это информационный термин, во втором – часть в составе молекулы, в третьем – отдельная часть молекулы; например, последовательность не обладает структурой, аффинностью, проч. К аналогичным типам ошибок относится и произвольное употребление терминов «состав» и «структура».

Работа Давыдовой А.С. апробирована на российских и международных конференциях, включая 43 конгресс ФЕБО (Прага, Чешская Республика в 2018 г.) и одну их ведущих конференций по аптамерам в Кембридже, Великобритания в 2017 г.

Работа Давыдовой А.С. опубликована в 6 статьях в рецензированных журналах, ссылка 3 в автореферате дана в английском варианте.

Сделанные замечания относятся только к дискуссионным частям работы и не подвергают сомнению саму работу в целом.

Автореферат полностью отражает содержание работы и соответствует самой диссертации.

Работа Давыдовой А.С. – цельное, законченное, актуальное научное исследование, результаты которого являются значимыми для данной области. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости диссертационная работа Давыдовой



А.С. отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН к кандидатским диссертациям. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.4.9 – биоорганическая химия (химические науки), 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 согласно Приложениям №5, 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а ее автор, Давыдова Анна Сергеевна, несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

профессор

кафедры химии природных соединений

химического факультета

Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

доктор химических наук



Копылов Алексей Михайлович

16 июня 2021 г.

119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, строение 3

телефон: (495) 939-16-71; E-mail: kopylov@genebee.msu.ru

