

ОТЗЫВ

Официального оппонента о диссертации **Бизяевой Анастасии Александровны** «АПТАМЕРНЫЕ НЕКАНОНИЧЕСКИЕ ДНК К ГЕМАГГЛЮТИНИНУ ВИРУСА ГРИППА А», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – Биоорганическая химия (химические науки).

Разработка новых методов диагностики и терапии вирусных инфекций является одной из приоритетных задач исследований в области естественных наук. Респираторные инфекции, вызываемые вирусами гриппа, остаются в числе основных угроз здоровью человека. Относительно новым инструментом для разработки диагностических систем и терапевтических препаратов являются аптамеры на основе нуклеиновых кислот. Аптамеры представляют собой высокоаффинные лиганды к выбранным мишеням. Аптамеры получают в процессе направленной эволюции комбинаторных библиотек на основе природных или модифицированных нуклеиновых кислот (SELEX). В частности, получен ряд ДНК и РНК аптамеров к гемагглютнину (ГА) вируса гриппа. ДНК аптамеры RHA0385 (G7), RHA006 (G6) и Bv42 (I5) являются предметом исследований в диссертации Бизяевой Анастасии Александровны. Важная особенность выбранных аптамеров заключается в их способности к образованию неканонических структур – G-квадруплексов различной топологии и i-мотива.

Задачей исследования, как указано в диссертации и автореферате, являлось выявление структурно-функциональных взаимоотношений для ДНК-аптамеров к ГА вируса гриппа А. Актуальность исследования не вызывает сомнений, поскольку выявление функциональной роли отдельных элементов структуры аптамерных лигандов позволяет не только описать характер межмолекулярного взаимодействия лиганд-мишень, но и сформировать основу для последующего рационального дизайна аптамеров к выбранным мишеням. Следует также отметить, что большинство работ, посвященных исследованию вновь получаемых аптамеров, не затрагивает структурных аспектов их взаимодействия с мишенями. Это обстоятельство подчеркивает важность исследования, проведенного Бизяевой Анастасией Александровной.

Диссертация изложена на 150 страницах и включает разделы Введение, Обзор литературы, Результаты и обсуждение, Материалы и методы, Заключение, Выводы и Список литературы, состоящий из 142 наименований. Работа содержит 58 рисунков и 16 таблиц.

Обзор литературы посвящен анализу литературы по аптамерам к вирусу гриппа. Обзор содержит подробную информацию о первичной и предполагаемой вторичной структуре аптамеров, их аффинным характеристикам, типе мишени и штаммах вируса. В обзоре также присутствует информация о современных методах оценки аффинности. Кроме того, представлено краткое описание некоторых биосенсоров на основе аптамеров к белкам вируса гриппа. Обзор

литературы является актуальным и содержит ссылки на работы 2021 года.

В разделе «Результаты и обсуждение» автор представил результаты проведенных исследований. Раздел состоит из трех частей, построенных по одинаковой схеме. Для каждого из трех объектов исследования представлены данные ЯМР, результаты исследования олигомеризации методом высокоэффективной эксклюзионной жидкостной хроматографии, структурные характеристики аптамеров и их производных по данным КД спектроскопии, термодинамические характеристики и результаты оценки аффинности, проведенные различными методами. Методология исследования базируется на выявлении роли отдельных элементов предполагаемой структуры с помощью модификации исходного аптамера. Поскольку объекты исследования содержат петли, собственно неканоническую структуру и, в двух случаях, участки ДНК дуплекса, автор использует замены на участках петель или дуплексов для выяснения роли этих фрагментов. В совокупности с широким набором методов исследования эта стратегия представляется весьма эффективной.

Первая часть раздела посвящена исследованию аптамера G7 и его производных. Автор убедительно доказывает мономолекулярный характер вторичной структуры G7, ее параллельную топологию и высокую стабильность квадруплекса в присутствии катионов калия. В разделе приводятся термодинамические параметры образования параллельного G-квадруплекса на основе G7 и некоторых его производных. Важно отметить, что автор особое внимание уделяет критериям отбора структур для оценки термодинамических параметров. Далее автор анализирует данные по кинетическим и равновесным параметрам аффинности комплексов G7 и его производных, которые были получены методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) с использованием иммобилизованных рекомбинантных ГА различных штаммов вируса гриппа. Показано, что G7 проявляет наибольшую аффинность в ряду исследованных вариантов. Кроме того, впервые показано, что G7 способен связывать ГА серотипов H7 и H9. Независимо, связывание G7 и его производных с ГА исследовалось методом интерферометрии биоконплексов (ИБ). Дополнительно были проведены исследования взаимодействия аптамера G7 и его производных с ГА в составе иммобилизованных инактивированных вирусных частиц методом аптаферментного анализа АФА. По результатам исследований G7, автор делает вывод о том, что узнающим элементом аптамера G7 служит сам каркас G-квадруплекса.

Во второй части раздела рассмотрен двухмодульный аптамер G6 и его производные. Методология исследования в целом воспроизводит таковую для G7. Совокупные данные указывают на то, что в растворах большинства аптамеров серии G6 преобладают две мономолекулярные конформации, причем топология двух модулей G6 соответствует гибридной и параллельной конфигурации. Аптамер G6 характеризуется относительно высокой стабильностью

в присутствии солей калия и аффинностью в субнанолярном диапазоне. Что касается функциональной роли отдельных элементов аптамера G6, автор выдвигает предположение о важной роли ребра квадруплекса, сформированного гуанозинами с анти-конформацией гликозидной связи.

Последняя часть раздела «Результаты и обсуждение» рассматривает аптамер I5, для которого предложена неканоническая структура на основе i-мотива. Образование i-мотива подтверждается данными ЯМР и КД спектроскопии и рН-зависимой стабильностью аптамера и его производных. Однако, дальнейшие исследования параметров аффинности свидетельствуют о том, что, по-видимому, i-образование мотива не является детерминантой взаимодействия I5 с ГА.

Диссертация Бизяевой А.А. впечатляет разнообразием методов исследований. Получены данные, свидетельствующие о важной роли непосредственно G-квадруплексов во взаимодействии с ГА. С учетом аффинности параллельных G-квадруплексов в отношении других белков (рецептор интерлейкина IL6, интеграза ВИЧ) этот результат представляется довольно интересным. Работа представляет заметный интерес и в практическом отношении, как основа для дизайна биосенсоров для детекции вирусов гриппа. Следует подчеркнуть, что настоящая работа выполнена на высоком профессиональном уровне и носит вполне завершённый характер. Научная новизна, актуальность и основные выводы работы не вызывают сомнений. Основные результаты опубликованы в научных журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, а также представлены на отечественных и зарубежных научных конференциях.

По существу представленной диссертации можно сделать следующие критические замечания:

- 1) Известно, что топология и стабильность G-квадруплексов сильно зависят от катиона. Вызывает сожаление тот факт, что не все варианты G-квадруплексов были исследованы в растворах, содержащих только соли натрия.
- 2) Исследования аптамера G6 показали, что эта структура сочетает два модуля разной топологии. Представленная автором предположительная структура аптамера, очевидно, не является единственно возможной. В отсутствие достоверных экспериментальных данных о структуре автор мог бы воспользоваться методами компьютерного моделирования структур (молекулярная динамика) для сравнительного анализа возможных вариантов. К сожалению, этой возможностью Анастасия Александровна не воспользовалась.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует

паспорту специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Бизьева Анастасия Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – «Биоорганическая химия» (химические науки).

Официальный оппонент:

доктор химических наук,

ведущий научный сотрудник лаборатории дизайна и синтеза биологически активных соединений ФГБУН Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта (ИМБ РАН)

Тимофеев Эдуард Николаевич

17 мая 2022 г.

Контактные данные:

тел.: +7 (985) 174-68-95, e-mail: edward@eimb.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.03 – Молекулярная биология

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН)

Тел.: +7 (985) 174-68-95, e-mail: edward@eimb.ru

Подпись ведущего научного сотрудника лаборатории дизайна и синтеза биологически активных соединений ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН (ИМБ РАН)

Тимофеева Э. Н. удостоверяю

Ученый секретарь ИМБ РАН

/к.в.н. Бочаров А.А./

МП