

## ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Усамы Аль Шанаа (Ousama Al Shanaa) на тему: «Синтез аптамеров РНК в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7. Генетика.

Диссертационное исследование Усамы Аль Шанаа (Ousama Al Shanaa), выполненное в Санкт-Петербургском государственном университете под руководством доктора биологических наук Марины Владимировны Падкиной, посвящено решению научно-практической задачи, связанной с биосинтезом коротких цепей РНК в клетках эукариотических микроорганизмов на примере разработки, создания и анализа эффективности синтеза флуорогенного РНК аптамера Broccoli в клетках *S. cerevisiae*. Сложность задачи определяется особенностями системы деградации РНК в клетках сахаромицет с одной стороны, а ее потенциальная выполнимость связана со сниженным риском существенных метаболических изменений в самих клетках под влиянием синтезируемой РНК из-за снижения регуляторной роли таких молекул, произошедшее в эволюции в ходе перехода к одноклеточности у этого вида эукариот.

Актуальность исследования определяется потенциалом использования РНК аптамеров для фундаментальных исследовательских и решения практических биомедицинских задач. Полученные результаты могут найти применение в практике производства фармпрепаратов и биосенсоров на основе РНК, а также вносят вклад в понимание метаболизма коротких РНК в клетках дрожжей сахаромицетов.

В работе впервые для синтеза аптамера РНК использована клеточная система на основе дрожжевых грибов, а гетерологическая транскрипция обеспечивалась эндогенной РНК-полимеразой II. Показана принципиальная возможность использования подобного подхода для масштабного микробиологического синтеза, а также изучено специфическое воздействие присутствия в клетках аптамера Broccoli на метаболизм клетки. Хотя обнаруженные изменения не влияют на потенциал применения разработанного подхода в биотехнологическом производстве биологически-активных компонентов на основе коротких РНК, важен сам факт наличия такого влияния. Он свидетельствует о том, что, несмотря на существенное сокращение роли регуляторных РНК у *S. cerevisiae*, они участвуют в регуляции отдельных процессов.

Русскоязычная версия Диссертации изложена на 118 страницах и является полным переводом англоязычной версии диссертации, представленной на рассмотрение. Она построена по традиционному плану. Текст хорошо структурирован и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение результатов, Выводы, Список литературы, а также Список сокращений, Приложение и Благодарности. Работа хорошо проиллюстрирована, она содержит 21 рисунок, а также 4 таблицы, из которых 3 в основном тексте работы и одна объемная (на 9 страницах) вынесена в Приложение. Список цитированной литературы включает 247 источников, из которых 2 на русском языке, включающих работы автора в соавторстве с коллегами и руководителем, что отвечает требованиям к диссертационным работам в СПбГУ.



Оформление текста диссертации в целом соответствует требованиям и производит положительное впечатление, хотя и содержит отдельные опечатки, неправильно использованные окончания и согласования, а также неверное использование знаков пунктуации и разноречивое использование обозначения знака «тире».

Глава «Введение» содержит общую характеристику работы, в ней автор подчеркивает актуальность выбранной тематики и степень ее разработанности. Цель исследования сформулирована достаточно четко, однако постановка задач не кажется удачной: вторая и третья задачи, по сути, являются составляющими первой. Это подтверждается выводами, к которым автор приходит в конце исследования, а также содержанием двух выносимых на защиту положений, сформулированных также во «Введении». Кроме того, этот раздел работы содержит информацию о научной новизне, теоретической и практической значимости исследования. Отдельно автор описывает свой личный вклад и выделяет участие соавторов в получении результатов. Помимо этого, кратко описана методология и перечислены основные методы исследования, информация об апробации работы, источниках финансирования и формальные характеристики рукописи диссертации. К сожалению, к обоснованию достоверности полученных результатов автор отнесся достаточно поверхностно и счел достаточным указать в соответствующем разделе только информацию об апробации.

Основной текст диссертации имеет четкую внутреннюю структуру и разбит на главы. Глава «Обзор литературы» начинается с определения понятий и характеристики методов подбора и селекции аптамеров различной природы, направленных на решение различных задач. В разделе «1.1.3. Функциональное и структурное разнообразие РНК как основа для получения аптамеров» автор предпринял попытку охарактеризовать все структурное и функциональное многообразие малых РНК, однако этот раздел трудно назвать удачным, т.к. представленная в нем информация не раскрывает его в полной мере. Нельзя утверждать, в данной работе действительно необходим такой полный охват, но это потребовало бы, как минимум, изменить название раздела на более узкое. В то же время, даже в рамках ограничения тематики этого раздела и его большей фокусировке на теме исследования, считаю его неудачным и неполным. Завершается первая часть главы описанием методов прижизненной локализации РНК в клетке с использованием методов флуоресцентной микроскопии, что удачно подчеркивает их потенциал для данной работы для предварительной оценки характеристик новых аптамеров *in vivo*. Во второй части главы «Обзор литературы» автор рассматривает особенности использования дрожжей *S. cerevisiae* для решения фундаментальных и прикладных задач, перспективы их использования для биотехнологической продукции аптамеров РНК. Недостатком этой части считаю отсутствие подробной информации об особенностях участия (неучастия) различных видов РНК в регуляции на клеточном уровне у выбранного вида дрожжей, его отличия от других дрожжевых грибов и многоклеточных эукариот. Это позволило бы более мотивированно объяснить выбор модельной системы, а также подчеркнуть ее достоинства и обозначить потенциальные недостатки.

Глава «Материалы и методы» содержит перечисление и описание использованных в работе методов генетики, молекулярной биологии и микробиологии, что свидетельствует о высокой квалификации подготовленного специалиста.



Глава «Результаты» содержит описание экспериментальной части исследования. Данные изложены последовательно в соответствии со списком задач и подробно проиллюстрированы. Достоверность полученных данных не вызывает сомнений. К недостаткам этого раздела нужно отнести использование некорректных формулировок, которые могут ввести читателя в заблуждение. Так, на стр. 159 (в русскоязычной версии) сталкиваемся с фразой «Последовательность тандемного повтора аптамера, фланкированного рибозимами, была получена химическим синтезом и клонирована сначала в промежуточную плазмиду pUC57 (Lumiprobe, Россия)». Возникает впечатление, что компания Lumiprobe является создателем коммерческой плазмиды pUC57, что, конечно же, не так, а также не определено четко, что эту рекомбинантную конструкцию не создавал автор работы, а она была приобретена готовой. Справедливости ради нужно отметить, что автор не пытается приписать себе заслуги создания плазмиды, т.к. ранее в таблице 2 четко указано ее происхождение, но это не отменяет использование неудачного выражения.

Интересным, на мой взгляд, является результат, показавший возможность транскрипции достаточно короткой последовательности РНК в клетках *S. cerevisiae* РНК-полимеразой II, однако сложно понять степень деградации этой РНК, которая может происходить до выщепления собственно аптамера. Полученный в работе результат об отсутствии влияния делеции гена экзонуклеазы Xrn1 на количество синтезируемого дрожжевой клеткой аптамера Broccoli лишь отчасти снимает этот вопрос, т.к. речь идет только об одной конкретной системе деградации РНК, которая в большей степени направлена на мРНК.

Глава «Обсуждение» начинается с общей характеристики результатов и потенциала для развития исследования, далее автор обсуждает отдельные результаты и интерпретирует данные. Отдельное внимание в этой главе уделено обсуждению причин выявленного увеличения активности транскрипции мРНК рибосомных белков. По мнению автора, наблюдаемые эффекты могут быть опосредованы активностью РНКазы III. Автор посчитал это достаточным основанием, для формулировки отдельного вывода о механизмах изменения транскриптома клеток *S. cerevisiae* на форме сверхпродукции аптамера Broccoli путем нарушения работы гена *RNT1*. Однако в экспериментальной части исследования эта гипотеза никак не проверялась, в связи с чем считаю заключение, вынесенное в формулировке четвертого вывода в работе, недостаточно обоснованным. Вместе с тем, непонятно, почему в выводы не вынесены достаточно обоснованные результатами исследования заключение о том, что экзонуклеаза Xrn1 не задействована в этом процессе.

К недостаткам работы следует отнести тот факт, что не каждая поставленная задача позволила прийти к формулировке выводов, возможно в будущем следует более тщательно подходить к планированию задач. Кроме того русскоязычный текст содержит не согласованные между собой предложения, что может быть следствием перевода с английского. Вместе с тем, отмеченные недочеты не умаляют ценности результатов диссертационного исследования.

Поставленная в работе цель достигнута, а полученные результаты диссертационного исследования вносят вклад в развитие генетики и биотехнологии и имеют потенциал для дальнейших исследований, а также внедрения в практику.

Результаты диссертационного исследования прошли апробацию на трех международных конференциях. По теме диссертации опубликовано четыре статьи в реферируемых научных изданиях.

С учетом всего вышесказанного полагаю:

Содержание диссертации Аль Шанаа Усамы (Al Shanaa Ousama) на тему: «Синтез аптамеров РНК в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*» соответствует специальности 1.5.7. Генетика;

Диссертация на тему: «Синтез аптамеров РНК в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*» является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний.

Нарушений пунктов 9, 11 Порядка присуждения Санкт-Петербургским государственным университетом ученой степени кандидата наук, ученой степени доктора наук соискателем ученой степени мною не установлено.

Диссертация соответствует критериям, которым должны отвечать диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук, установленным приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете» и рекомендована к защите в СПбГУ.

Член диссертационного совета

д.б.н., доцент,  
профессор кафедры анатомии  
и физиологии человека и животных  
РГПУ им А.И.Герцена

Алсу Фаритовна Сайфитдинова

РГПУ им. А.И. ГЕРЦЕНА

подпись Сайфитдиновой

Алсу Фаритовны

удостоверяю «28» 11 2023г.

Отдел кадров управления по работе с кадрами  
и организационно-контрольному обеспечению



Ведущий специалист по кадрам  
Отдел кадров

Н.В.Курзакова