

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М.ШЕМЯКИНА И Ю.А.ОВЧИННИКОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК (ИБХ РАН)**

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН

14 марта 2018 года

Защита диссертации

на соискание учёной степени кандидата химических наук

Апарина Ильи Олеговича

«Азидопроизводные красителей и ненуклеозидные реагенты на основе хиральных 1,3-диолов для синтеза флуоресцентных ДНК-зондов»

по специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия

Москва

2018 г.

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН

14 марта 2018 года

Заместитель председателя диссертационного совета
доктор физико-математических наук

Р.Г. Ефремов

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 23 человека, из них докторов по профилю диссертации – 7.

1.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
2.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
3.	Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
4.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
5.	Академик РАН	Богданов Алексей Алексеевич	(03.01.03)
6.	Академик РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
7.	Член-корр. РАН	Деев Сергей Михайлович	(03.01.03)
8.	Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(02.00.10)
9.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
10.	Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
11.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
12.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
13.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
14.	Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
15.	Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
16.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(02.00.10)
17.	Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
18.	Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
19.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
20.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
21.	Член-корр. РАН	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
22.	Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
23.	Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)

Ефремов Р.Г.:

Уважаемые коллеги, предлагаю открыть следующее заседание нашего диссертационного совета, посвященное защите Апариным Ильей Олеговичем кандидатской диссертации на тему: «Азидопроизводные красителей и нуклеозидные реагенты на основе хиральных 1,3-диолюв для синтеза флуоресцентных ДНК-зондов». Предполагается защита на степень кандидата химических наук по специальности биоорганическая химия. Научный руководитель: доктор химических наук, профессор Формановский Андрей Альфредович. Владимир Александрович, доложите, пожалуйста, об основных положениях дела соискателя.

Олейников В.А.:

Илья Олегович Апарин, Российская федерация, окончил химический факультет МГУ по специальности «химия» в 2012 году. С 2012 по 2016 – аспирант, а с 2016 по настоящее время – инженер лаборатории органического синтеза Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН. Кандидатский экзамен по специальности "биоорганическая химия" сдан с оценкой "хорошо". Работа выполнена в лаборатории органического синтеза нашего института. Научный руководитель диссертационной работы д.х.н. Формановский Андрей Альфредович (заведующий лабораторией органического синтеза ИБХ РАН). По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя 28.12.2017 г. Все необходимые документы в «деле» имеются.

Ефремов Р.Г.:

Уважаемые коллеги, имеются ли какие-либо вопросы по личному делу соискателя, процедуре защиты? Если вопросов нет, тогда, Илья Олегович, Вам предоставляется слово для изложения основных результатов диссертации. 20 Минут, пожалуйста.

Апарин И.О.:

(Излагает основные положения диссертационной работы).

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Вопросы, пожалуйста, уважаемые коллеги. Да, пожалуйста, Алексей.

Пахомов А.А.:

Скажите, квантовый выход вы оценивали для ваших эксимеров? И у вас рост Су3 квантового выхода при FRET-процессе чем обусловлен?

Апарин И.О.:

Спасибо большое за вопрос. Нет, к сожалению, квантовый выход для эксимера мы не оценивали, потому что данный флуорофор является не очень удачным для определения как относительного, так и абсолютного значения квантовых выходов из-за широкого спектра эмиссии, т.е. попросту подобрать стандарт для определения его квантового выхода не очень просто. Определение квантовых выходов сульфо-Су3 мы проводили на основе флуорофора Су3 самого же не в составе олигонуклеотидов, чей квантовый выход подробно описан на сегодняшний день. А увеличение интенсивности флуоресценции акцептора в нашей системе протекает за счет, как я ранее уже говорил, сближения донора и акцептора исключительно на комплементарной матрице. В отсутствие матрицы два зонда находятся в растворе в низких концентрациях, гибридизуясь с комплементарной матрицей происходит сближение донора и акцептора и становится возможным резонансный перенос энергии возбуждения с эксимерного донора на акцепторный сульфо-Су3. За счет этого происходит увеличение квантового выхода и интенсивности флуоресценции. Вот здесь представлен профиль титрования обоих зондов комплементарной матрицей в отсутствие комплементарной матрицы и при однократном избытке.

Ефремов Р.Г.:

Так, еще вопросы, пожалуйста? Да, Дмитрий Александрович?

Долгих Д.А.:

Скажите, пожалуйста, конкретный иммуноглобулин, который вы использовали это просто совершенно случайный модельный объект или может он имеет какое-то дальнейшее применение в том же кардиоцентре или откуда вы его взяли?

Апарин И.О.:

Да, Вы знаете, эту работу мы делали совместно с нашими коллегами из кардиоцентра. К сожалению, природа этого иммуноглобулина нам неизвестна. Нам известно, что это моноклональное антитело, иммуноглобулин G человека, который в дальнейшем бы использовался для определения модельных объектов биологами для апробации иммуно-полимеразной цепной реакции. Нашей задачей стояло создать такой метод введения олигонуклеотидов к иммуноглобулину, который бы позволил нам как-либо характеризовать полученные конъюгаты.

Ефремов Р.Г.:

Так у меня есть вопрос. А вот, да, пожалуйста, Сергей Кириакович.

Завриев С.К.:

У меня короткий вопрос. Илья, вы проверяли аффинность сохраняется вот таких антител модифицированных?

Апарин И.О.:

Я лично не проверял, но...

Завриев С.К.:

Не Вы лично, а кто-нибудь проверял? Потому что, так сказать, смысл, так сказать, этой модификации сохраняется в том случае, если сохраняется аффинность. Потому что, если они теряют аффинность после этой модификации, то, как бы...

Апарин И.О.:

Да, спасибо большое за вопрос. Мы планируем это сделать. Нами были получены предварительные данные по модифицированным антителам нашим реагентом на основе сульфо-Су5, не содержащих олигонуклеотидов. Как было показано аффинность свою они не теряют, но, к сожалению, это ничего не может сказать о конъюгатах олигонуклеотидов с антителами. И эти данные, в ближайшее время, я надеюсь, мы получим.

Ефремов Р.Г.:

Ну, мой вопрос Сергей Кириакович немного предварил. Относится к той же теме. Когда идет речь о модификации и использовании флуоресцентных зондов, это большие, как правило, гидрофобные молекулы, которые могут достаточно сильно менять физико-химические свойства молекул, к которым они присоединяются. Так вот, вопрос по первой части, по меткам: не влияет ли присоединение сразу двух таких флуорофоров на их способность к гибридизации, связывание с матрицей, степень комплементарности и так далее – их функциональным каким-либо характеристикам?

Апарин И.О.:

Да, спасибо большое за вопрос. К сожалению, это действительно так. При высоких степенях модификации иммуноглобулина низкомолекулярными соединениями неоднократно было отмечено, что аффинность иммуноглобулина может снижаться вплоть до денатурации белка. С этой целью мы использовали водорастворимый цианиновый краситель, содержащий две сульфо-группы, который не обладал бы неспецифическим связыванием с нашим белком, то есть он растворим в воде и он не склонен к неспецифическим взаимодействиям с белками. Так же хотелось бы сказать, что при высоких степенях модификации иммуноглобулина нашим реагентом, мы наблюдали действительно денатурацию и выпадение в осадок антитела. Однако в многочисленных публикациях, которые описывали бы сохранение аффинности иммуноглобулина при модификации его какими-либо флуорофорами или кросс-сшивающими линкерами при небольших степенях мечения порядка трех или пяти остатков реагентов на один иммуноглобулин аффинность оно сохраняет практически полностью. Изучение же

аффинности иммуноглобулина конъюгированного с олигонуклеотидом, конечно, задача более сложная и ее нужно изучать далее.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо, но только вопрос был не про аффинность иммуноглобулинов, а по первой части Вашей работы, про функциональные свойства эксимеров, с добавленными флуорофорами. Когда они с матрицей взаимодействуют. Когда эксимер раскрывается и...

Апарин И.О.:

Да, я понял. Флуоресцентный краситель в составе олигонуклеотидных зондов редко меняет его гибридизационные качества. Он, как правило, оказывает влияние на температуру плавления самого зонда, но при этом аффинность зонда к комплементарной матрице, если вопрос в этом, она редко меняется.

Ефремов Р.Г.:

То есть это проверялось, это показано?

Апарин И.О.:

Да, это показано. То есть, вот в данном случае (*показывает на слайд*) здесь приведена картинка титрования комплементарной матрицы двумя зондами в концентрации однаномолярной. При этом стоит сказать когда мы титровали оба зонда комплементарной матрицей, которая связывалась бы лишь с одним зондом увеличение флуоресцентного сигнала было незначительным. То есть здесь мы показали, что оба наших зонда высокоаффинны к комплементарной последовательности, даже в вариантах, когда один из зондов лишь половиной своей последовательности гибридизуется с комплементарной матрицей.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Коллеги, есть еще вопросы к соискателю? Если нет, то, пожалуйста, пока отдохните. Мы приступаем к рассмотрению письменных отзывов, отзыва ведущей организации, который поступил в совет.

Олейников В.А.:

Ведущая организация это Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Отзыв полностью положительный, ну и соответственно, что в отзыве пишется:

(Зачитывает отзыв, отзыв прилагается).

Работа Апарина посвящена улучшению фотофизических свойств зондов за счет использования новых флуоресцентных меток и оптимизации структуры самих олигонуклеотидных зондов, а также развитию методологии конъюгации олигонуклеотидов с помощью «клик»-реакций. Актуальность настоящей работы сомнений

не вызывает. Основные задачи диссертационной работы это: 1) разработка новых коротковолновых флуорофоров, 2) апробация нестандартной комбинации пиреновый эксимер/Су₃, 3) улучшение способов конъюгации олигонуклеотидов с флуоресцентными красителями.

Работа построена традиционным образом: введение, обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальная часть, выводы и литература. Обзор литературы «Флуоресцентные ДНК-зонды» посвящен описанию каркас-модифицирующих реагентов для введения меток в состав олигонуклеотидных зондов. Обзор изложен на 61 странице, опирается на 290 литературных источников. «Обсуждение результатов» является логическим изложением и анализом экспериментальных данных, хорошо проиллюстрирована рисунками и таблицами.

Автором разработанный подход может быть также использован для модификации других биомолекул или, например, для иммобилизации их на твердой поверхности и наночастицах. Среди новых научных результатов диссертации необходимо отметить разработку нового хирального нуклеозидного каркаса на основе коммерчески доступного D-пантолактона для синтеза амидофосфитных синтонов и полимерных носителей. Автором получен ряд азидопроизводных флуоресцентных меток. Эксперименты автором грамотно спланированы и скрупулёзно описаны.

Вместе с тем, к тексту диссертации есть несколько замечаний и вопросов:

В качестве замечания необходимо отметить отсутствие формулировки цели и постановки задач исследования, как во введении, так и в самом тексте диссертации, в то время как в автореферате диссертации они приведены. В тексте обзора литературы встречается достаточно большое количество описаний реакций и структур зондов, не подкрепленных схемами или рисунками, что затрудняет восприятие материала. В связи с большим количеством литературных источников, использованных в обзоре литературы, и относительно сжатым объемом обзора, некоторые части обзора изложены достаточно поверхностно. Более полезным мог бы быть обзор на более узкую тему, но содержащий более подробное обсуждение. Название главы «Обсуждение результатов» - «Мономеры на основе D-(-)-пантолактона и азидопроизводные для мечения олигонуклеотидов», не соответствует названию диссертационной работы. Ссылка 299, приведенная в разделе «Обсуждение результатов» при обсуждении свойств полученных в данной работе флуоресцентных зондов в сравнении с ранее опубликованными результатами, относится к статье, внесенной в список публикаций, в которых опубликованы результаты диссертации. В разделе 2.1.2 при обсуждении результатов термической денатурации «шпилечных» структур зондов утверждается, что происходит повышение температур

плавления за счет взаимодействия остатков флуорофоров и тушителей, введенных на третьем и пятом концах зонда, друг с другом или с последовательностью зонда. На каком основании делается этот вывод? В таблице 2.2, на которую ссылается автор, отсутствуют данные о температурах плавления немодифицированной олигонуклеотидной конструкции или конструкций, содержащих частичную модификацию. В разделе 2.1.3. при сравнении данных по тушению флуоресценции эксимерной флуоресценции дополнительно введенным в структуру зонда тушителем с литературными данными оказалось, что введение дополнительного тушителя в структуру зонда не приводит к желаемому эффекту, в отличие от зондов, меченных FAM и JOE. Чем соискатель может объяснить это явление? Для этих же зондов отмечено, что значительный вклад в фоновую флуоресценцию зонда оказала терминальная пара нуклеотидов, расположенная на конце стебля. За счет чего может происходить такое влияние концевой пары? В разделе 2.3 описано введение до 15 линкерных групп, содержащих Су5 и азидогруппу, в состав иммуноглобулина G, а также последующее присоединение модельных олигонуклеотидов по этим группам. Есть ли необходимость столь множественной модификации и будет ли сохраняться функциональная активность иммуноглобулина в результате таких изменений в структуре? По всему тексту диссертации мономерные синтоны для твердофазного амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов называются автором фосфамиды или даже иногда амидиты, что относится к научным жаргонизмам. В тексте диссертации содержится заметное количество опечаток и неудачных выражений (например, стр. 8, 10, 32, 38, 41, 93, 98, 151(Выводы) и др.).

Но приведенные замечания не снижают общего высокого уровня исследования, не влияют на теоретические и практические результаты и не изменяют общего положительного впечатления от рассматриваемой работы. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Диссертация является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным автором самостоятельно на высоком уровне. Результаты могут быть использованы: целый ряд организаций куда предлагается...

Ну и наконец, диссертационная работа Апарина Ильи Олеговича соответствует требованиям «Положения о присуждении учёных степеней». И, соответственно, он, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Отзыв обсужден и утвержден на межлабораторном научном семинаре Лаборатории химии РНК и Лаборатории биомедицинской химии. И, соответственно, протокол указан, подписан старшим научным сотрудником Лаборатории химии РНК, кандидатом химических наук Новопашиной Д.С. И я повторяю, что отзыв утвержден директором

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН Пышным Д. В.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Илья Олегович, Вам предоставляется слово для ответа на замечания.

Апарин И.О.:

В первую очередь я бы хотел поблагодарить ведущую организацию в лице Новопашиной Дарьи Сергеевны. С вашего позволения я бы хотел начать по порядку.

Что касается количества описаний реакций и структур зондов. Как ранее отмечалось, список литературы содержит порядка трехсот ссылок на источники, половина из которых примерно содержит уникальные структуры зондов и принципы заложенные в их основу. Изложение графически всего этого материала в обзоре литературы диссертации не представлялось бы возможным. Мы исключили наиболее экзотичные и малоиспользуемые структуры зондов и типы реакций. И, хотелось бы сказать, что те структуры зондов и реакции, которые были опущены, как правило, в тексте диссертации описаны вслед за аналогичными.

Что касается поверхностного изложения некоторых глав диссертации я бы хотел сказать следующее. В нашей работе мы постарались решить довольно разноплановые задачи с использованием одинаковых или подобных методов. И обзор на узкую тему не отображал бы сути данной работы. Обзор литературы составлен таким образом, что в нем приводятся основные сведения для дизайна олигонуклеотидных зондов, начиная с флуоресцентных красителей, тушителей флуоресценции, резонансного переноса энергии, переходя уже к классификации структур зондов и методам усиления флуоресцентного сигнала. На наш взгляд 61 страница это довольно обширный литературный обзор, и главы, которые имеют косвенное отношение к дизайну зондов или слишком обширные, как скажем резонансный перенос энергии или некоторые структуры зондов, по которым опубликовано несколько книг, были включены довольно сжато, чтобы погрузить читателя в основы дизайна олигонуклеотидных зондов.

Да, что касается сравнения полученных эксимерных зондов по температурам плавления, мы сравнивали их не с немодифицированными, а с классической структурой зондов, меченных карбоксифлуоресцеином на 5'-конце и тушителем флуоресценции Black Hole Quencher 1, которая была опубликована нами ранее. И температуры плавления по флуоресценции для таковых же зондов определялись в сходных условиях. Кроме того, хотелось бы сказать, что факт увеличения температуры плавления шпилечных зондов, при введении на 5'- и 3'-конец модификаций, был неоднократно описан в литературе. В том числе, мы находили подтверждение ему в наших работах. Здесь стоило привести первую

публикацию, содержащую ряд флуоресцентных красителей и тушителей флуоресценции на концах шпилечных молекулярных маяков. При этом, авторы данной работы отмечают, что олигонуклеотид характеризуется температурой плавления 49 градусов, а все зонды содержащие модификации обладают температурой плавления более 50 градусов. И на сегодняшний день найти модификацию, которая не повышала температуру плавления или даже снижала ее, является нетривиальной задачей.

Теперь, о введении 15 линкерных групп в составе кросс-сшивающего линкера основе сульфо-Су5 к иммуноглобулину. Да, действительно, это довольно высокая степень модификации для антител и в некоторых наших экспериментах при такой степени модификации мы наблюдали денатурацию и выпадение антитела в осадок. На практике же такая степень модификации не находит никакого применения, поскольку вызывает также снижение и аффинности антитела к эпитопу. Но здесь было любопытно определить пороговое значение, при котором иммуноглобулин начинает терять свою аффинность к мишени. Таким образом, нами была проведена серия экспериментов с заведомо высокими концентрациями нашего реагента к иммуноглобулину.

С остальными замечаниями я с вашего позволения соглашусь. Еще раз хочу поблагодарить Дарью Сергеевну за детально проработанный отзыв. Спасибо.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Теперь согласно протоколу у нас отзыв научного руководителя, но, насколько я понял, Андрей Альфредович отсутствует сегодня.

Олейников В.А.:

Да, он болен, к сожалению.

Ефремов Р.Г.:

Поэтому Владимир Александрович зачитает письменный отзыв Формановского Андрея Альфредовича.

Олейников В.А.:

Отзыв научного руководителя на инженера группы биоконъюгации Апарина Илью Олеговича.

Апарин присоединился к группе биоконъюгации в марте 2012 г, после окончания химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова в 2012 г поступил в очную аспирантуру ИБХ РАН в лабораторию органического синтеза. Предметом его исследовательской работы, а позже и кандидатской диссертации, стал синтез модифицирующих реагентов и изучение полученных на их основе флуоресцентных ДНК-зондов. Также Апарин И.О. освоил методы конъюгации биомолекул, в частности олигонуклеотидов и иммуноглобулинов. В ходе выполнения междисциплинарных

исследований, которые легли в основу его диссертации, он расширил свой кругозор не только в органическом синтезе, но также приобрел навыки работы с биополимерами и их анализа. Он зарекомендовал себя как активный член коллектива, как в научной работе, так и в общественной жизни лаборатории. Илья Олегович участвовал в исследовательской работе на всех ее этапах, начиная с постановки задач и проведения экспериментов до написания и подачи статей в иностранные журналы. За время своей аспирантуры он проявлял творческий подход к решению исследовательских задач, взаимодействуя с сотрудниками не только своей группы, но также и других подразделений и научных организаций.

Илья Олегович обладает аналитическим складом ума, целеустремленностью и отличной работоспособностью; он показал себя грамотным и квалифицированным специалистом, способным доводить до конца поставленные задачи. Уровень его подготовки и полученные результаты свидетельствуют о том, что Илья Олегович является сложившимся специалистом, полностью соответствующим степени кандидата химических наук. Научный руководитель – доктор химических наук, заведующий лабораторией Формановский Андрей Альфредович

Ефремов Р.Г.:

Спасибо, Владимир Александрович. Поступили ли отзывы на автореферат?

Олейников В. А.:

Нет, на автореферат не поступили.

Ефремов Р.Г.:

Уважаемые коллеги, тогда мы приступаем к дискуссии. И слово предоставляется официальному оппоненту Тимофееву Эдуарду Николаевичу, доктору химических наук, ведущему научному сотруднику лаборатории стереохимии ферментативных реакций Института молекулярной биологии Российской Академии Наук.

Тимофеев Э.Н.:

Уважаемые коллеги и уважаемые члены диссертационного совета, сегодня мы рассматриваем диссертацию Апарина И.О., которая посвящена разработке новых реагентов для гибридизационного анализа на основе реакционноспособных производных красителей, а также исследованию характеристик флуоресцентных зондов. Актуальность данной работы по-моему не вызывает никаких сомнений, потому что есть два аспекта, которые это подтверждают. Первое – это методы флуоресцентного анализа, основанные на тушении и переносе энергии, занимают все больше места в самых разных исследованиях и в структурных исследованиях нуклеиновых кислот, поэтому можно только приветствовать развитие подходов с этим связанных. И второй момент - это то, что

этим методы используются в клинической диагностике. Под это работает целая индустрия. Существуют приборы, которые ориентированы именно на эти методы. В данной работе сделан довольно сильный акцент на тоже очень важное и популярное направление это «клик»-реакции. Синтезировано очень большое количество соединений, которое нацелено на использование «клик»-реакций. И еще хочется отметить важный аспект, отдельная часть работы была ориентирована на модификацию процедур биоконъюгации, в частности это использование биоконъюгации непосредственно в олигонуклеотидном синтезе на твердой фазе, и также разработка новых подходов к контролируемой биоконъюгации на примере IgG. Работа построена традиционно. Довольно обстоятельный обзор. Я видел там ссылки 2016 года, т.е. он достаточно современный. Обзор рассматривает принципы конструирования зондов, типы зондов, особенности флуоресцентной гибридизации *in situ*, рассмотрены теоретические основы FRET. Рассмотрены многочисленные аспекты использования зондов: это стабильность олигонуклеотидной цепи, наличие модификаций, введения флуорофоров и тушителей. Особое внимание в силу специфики диссертации уделено эксимерам и эксиплексам. И там есть отдельный раздел, посвященный *in situ* гибридизации (FISH). Любопытный раздел, правда, мне показалось, что он как-то особняком стоит, может быть его появление имеет какую-то предысторию, правда мне показалось, что первые два раздела связаны, а FISH несколько отдельно... Соответственно, что можно сказать... Какие замечания есть к лит. обзору. У меня есть два здесь замечания, помимо тех, что уже были высказаны. Там есть довольно любопытные структуры линкеров, и я на них ссылок не нашел. А, скажем, лично мне они могли бы пригодиться. Это очень обидно. А второй момент, в работе дальше рассматривается перенос энергии с эксимера на Cu_3 , очень обстоятельная часть этой работы. А в лит. обзоре отсутствует ссылка и рассмотрение одной публикации 2012 года в *Chemical Communication*, там рассматривался перенос с эксимера на Cu_5 , сдвиг побольше, может быть эффективность поменьше, но было бы любопытно сравнить и то, и другое. В результатах и обсуждении три раздела, в первом рассмотрены молекулярные маяки на основе пиренов с Dabcyl и с пиреном и Cu_3 -красителем. Мне кажется огромной заслугой автора является его синтетический вклад. Он создал целую базу реагентов, которые позволили ему двигаться дальше. То есть, я считаю, что это довольно важно отметить. Автор далее рассматривает закономерности образования гетеродуплесов, закономерности проведения анализа. Выявлены преимущества конфигурации, в которой используется пиренкарбоновые кислоты, далее детально рассматривается использование переноса энергии. Были выявлены оптимальные конфигурации смежных зондов, определены параметры FRET и его эффективность. Вторая часть посвящена синтезу довольно

заметного числа азидов красителей для твердофазной модификации и это чрезвычайно актуальная вещь, потому что, ну, я в своей практике довольно часто сталкивался с ситуацией, когда у меня не было под рукой подходящих реагентов, чтобы поставить тот или иной краситель или тушител. Я считаю, что это чрезвычайно важная часть работы. Здесь маленькая ложка дегтя, это несимметричный аминоказид, в общем, как он получается примерно понятно, но хотелось бы иметь методику и она отсутствует в экспериментальной части. Это не очень хорошо, хотя это соединение, конечно, промежуточное и не очень, может быть важное. Среди синтезированных соединений был соответственно фенилэтинилпирен и его исследованию посвящена вторая часть работы. Были разработаны новые зонды для real-time PCR, был проведен сравнительный анализ на TaqMan зондах с аминокумарином и Alexa Fluor и, получены довольно интересные результаты, которые говорят о том, что этот краситель может быть использован в качестве замены аминокумарина и Alexa Fluor.

Заключительная часть посвящена конъюгации с иммуноглобулином. Я не видел ничего похожего в отношении линкера на основе Су5, который позволяет контролировать степень конъюгации. Это мне кажется довольно важное достижение в работе. Автор использует «клик»-химию без меди, что тоже, довольно большое преимущество, хотя это методы разработанные, в данном случае это тоже важно отметить. Диссертация, помимо всего прочего, меня впечатлила объемом синтетической работы, здесь довольно много всего синтезировано. Разработаны эффективные и перспективные процедуры гибридизационного анализа. Работу отличает уникальное сочетание фундаментального характера и прикладной практической направленности. Она выполнена на высоком уровне, носит завершённый характер. Научная новизна, актуальность, выводы сомнений не вызывают. Теперь замечания:

Вот по поводу определения температуры плавления маяков. Я так понимаю, что это все производилось на приборе real-time PCR. Проплавили, посмотрели по флуоресценции сначала собственно сам маяк-шпильку, потом добавили мишень и тоже проплавили и посмотрели по флуоресценции. И это называется температура плавления гетеродуплекса. На самом деле там все должно быть сложнее, потому что это многокомпонентная система и это не совсем отражает температуру плавления гетеродуплекса. Вот было бы, наверно, правильно синтезировать не содержащую боковых последовательностей шпильку, гибридизовать ее и посмотреть по температуре плавления либо по флуоресценции, либо по ультрафиолету, так или иначе. Это не отменяет ценности того, что сделано, но наверно совсем бы не помешало. Дальше там в методике не совсем понятно зачем добавляются те или иные компоненты при определении температуры

плавления. Там есть такой реагент PCRmix-2-FRT, я не знаю что это такое, там не написано и, в общем, непонятно зачем. Еще добавляются нуклеозидтрифосфаты, это тоже непонятно зачем. Концентрация олигонуклеотидов и состав буфера не указан.

И еще один вопрос, связанный с температурами плавления. Поскольку эффект виден там был, что гидрофобные добавки меняют температуру плавления шпилек самих по себе, и, соответственно и меняют температуру плавления гетеродуплексов, то вот эти различия они будут определять в какой-то мере соотношение открытых и закрытых форм шпильки этого маяка в растворе. Соответственно будет меняться соотношение полос флуоресценции. Там есть таблица с температурами плавления, если не ошибаюсь четырнадцатый там был beacon и вот он единственный имел по-моему температуру плавления гетеродуплекса выше, чем шпильки и вот он оказался очень хорошим. Нет ли здесь какой-либо корреляции? Хотелось бы понять.

Все эти вопросы, конечно, интересные, но на ценность работы, на ее значимость это никак не влияет. Поэтому дальше должна быть такая фраза, что автореферат и опубликованные статьи в полной мере отражают содержание диссертации. Выводы, сделанные автором, обоснованы и подтверждены результатами проведенных исследований. Представленная работа соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», а сам диссертант Апарин Илья Олегович, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10. Спасибо!

Ефремов Р.Г.:

Спасибо, Эдуард Николаевич. Так, Илья Олегович, пожалуйста, ответьте на замечания.

Апарин И.О.:

Эдуард Николаевич, спасибо большое за отзыв. С вашего позволения, я начну по порядку. Что касается раздела, посвящённого FISH. Да, действительно, наши зонды к флуоресцентной гибридизации *in situ* пока не имеют отношения, однако в этом методе нередко стоит задача усиления флуоресцентного сигнала, и в моей работе рассматривались подходы для усиления флуоресценции как с помощью самих флуорофоров, так и при помощи различных подходов и олигонуклеотидных конструкций в FISH-анализе. Мне показалось, что это было бы любопытно для людей, заинтересованных в различных подходах к дизайну олигонуклеотидных зондов. По поводу ссылки 2012 года. Если мне не изменяет память, эта работа была сделана в группе Роберта Хайнера и опубликована в *Angewandte Chemie*, если я не ошибаюсь.

Тимофеев Э.Н.:

В Chemical Communication.

Апарин И.О.:

Да, прошу прощения. Да, действительно, там описаны довольно специфические структуры зондов. Следующей структуры (показывает на слайд), когда пиреновый эксимер вводился в середину молекулярного маяка. Да, мы указали несколько источников, где приводится резонансный перенос с эксимера на другие красители в составе других олигонуклеотидов или зондов и, к сожалению, пропустили эту ссылку. Да, надо было ее включить.

Что касается рисунка с нуклеозидными линкерами, которые позволяют ввести модификацию в состав олигонуклеотида. На этом рисунке представлено довольно много разнообразных структур, и под этим рисунком, тем не менее, мы не приводим какого-либо детального анализа этих структур, при этом количество ссылок составляло бы порядка 50. На основе этого мы их просто не включали в обзор литературы, но в опубликованной работе в журнале Органической химии за 2017 год все эти ссылки присутствуют. Там приведен подобный рисунок со структурами линкеров.

Далее я хотел бы прокомментировать замечание по поводу температуры плавления. В наших экспериментах не очень корректно называть температурой плавления дуплекса зонда с мишенью определяемые нами параметры. Однако стоит отметить, что они носят прикладной характер в части олигонуклеотидных зондов, которые использовались для ПЦР, и нам было бы любопытно определить значение увеличения флуоресцентного сигнала на данных зондах непосредственно в условиях, приближенным к ПЦР. Нередко складываются такие ситуации, когда флуоресцентный зонд попросту не работает в системе, и неясно, связано ли это с деградацией зонда, его неудачным дизайном, вторичной структурой и выбором последовательности, поэтому температуру плавления мы определяли таким методом.

Что касается эксимерных зондов и определения их температуры плавления нами были заведомо выбраны шпильчатые структуры, которые содержали заведомо большой само-комплементарный участок. При этом температура плавления таких зондов, модифицированных, скажем, флуоресцеином или Black Hole Quencher 1, составляли бы более 60 градусов. Таким образом, перегиб кривой температурного плавления происходит где-то в районе 40-50 градусов. На самом деле, для разных структур по-разному. Тем не менее, стоит сказать, что при комнатной температуре мы находимся на плато флуоресценции, т.е. когда дуплекс гибридизован с комплементарной ему мишенью. Кроме того, мы сравниваем олигонуклеотидные зонды в составе этих двух последовательностей друг отдельно от друга, и отмечаем это. Температуры плавления таких шпильчатых

структур и гетеродуплексов с мишенью достигали от 60 до 80 градусов в среднем. Таким образом, при комнатной температуре мы полагали, что они находятся в самокомплементарной шпильке, либо в составе гетеродуплекса с мишенью, поскольку они выигрывали в температуре плавления.

С остальными замечаниями и пояснениями я вынужден согласиться. Еще раз спасибо за отзыв.

Ефремов Р.Г.:

Эдуард Николаевич, Вы удовлетворены ответами защиты соискателя? Спасибо.

Следующий оппонент у нас Готтих Марина Борисовна, д.х.н., профессор главный научный сотрудник отдела химии нуклеиновых кислот Института физико-химической биологии им. Белозерского МГУ. Она отсутствует, поэтому отзыв зачитает Владимир Александрович.

Олейников В.А.:

Вот у меня в руках отзыв, который подписан Мариной Борисовной Готтих. Отзыв полностью положительный.

(Зачитывает отзыв, отзыв прилагается).

Он начинается с актуальности, о том, что актуальность данной работы в первую очередь определяется важностью и широчайшим использованием технологий с применением флуоресцентных ДНК-зондов, но существует ряд проблем создания таких зондов и ценность работы Апарина состоит в том, что она нацелена на решение практически всех указанных выше проблем. Соответственно, обоснованность данной работы не вызывает никаких сомнений.

Диссертация И.О. Апарина построена по стандартному принципу. Введение: очень четко и конкретно описаны актуальность исследования, его научная новизна, практическая ценность, цель и задачи диссертационной работы. Обзор данных литературы самым непосредственным образом связан с темой диссертации, носит аналитический и целенаправленный характер и помогает читателю лучше понять направление исследований и значимость проделанной диссертантом работы. Единственное небольшое замечание касается не очень удачных рисунков 1.22 и 1.23, которые должны были бы иллюстрировать схемы матричного лигирования олигонуклеотидов, а на самом деле лигирование на них происходит отдельно от матрицы.

Раздел «Обсуждение результатов» состоит из трех больших подразделов, первый из которых посвящен созданию новых типов зондов, содержащих флуорофоры на основе пирена. Далее подробно описывается важность результатов достигнутых.

Вторая часть работы И.О. Апарина крайне интересна и важна не только тем, кто занимается детекцией нуклеиновых кислот, но и гораздо более широкому кругу специалистов. В этой части Апарин постарался оптимизировать условия медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения для получения конъюгатов олигонуклеотидов с азид-содержащими соединениями. Помимо этого в работе была получена значительная библиотека азидопроизводных ряда флуоресцентных красителей, биотина и холестерина.

Практическая направленность работы Апарина четко проявилась и в последней части диссертации, посвященной получению конъюгатов олигонуклеотидов с иммуноглобулинами. Все указанные выше результаты являются оригинальными и ярко отражают новизну данной работы. Разработанные И.О. Апариним методы и предложенные им реагенты создают основу для последующих фундаментальных и прикладных исследований в медицинской диагностике, геномике, агрохимии, вирусологии, молекулярной и клеточной биологии.

Подводя итог, необходимо отметить высокое качество не только экспериментальной работы диссертанта, но и подготовки диссертации. Вся работа очень хорошо структурирована, снабжена четкими и аккуратными рисунками и схемами и понятными таблицами. Принципиальных замечаний к содержанию диссертации нет. Надо, однако, отметить досадно большое количество стилистических и грамматических ошибок и опечаток. В работе также присутствует достаточно много неудачных оборотов и выражений: «фосфорамидит» (вместо «амидофосфита»), «ненуклеозидный каркас мономеров для синтеза олигонуклеотидов» (получается, что можно синтезировать олигонуклеотид из ненуклеозидных мономеров), «мономерный состав пиреновой метки» (вместо «субъединичного состава» или просто «состава»), «широкая полоса эксимера перекрывается с поглощением...», «время жизни флуоресценции эксимера», «пост-модификация» (вместо «пост-синтетическая модификация») и других. В подписи к рис. 1.27 указано «Деградация флуоресцентного зонда TaqMan на комплементарной матрице полимеразой с рестриктазной активностью», но «рестриктазной активности» не бывает, очевидно, имеется в виду нуклеазная активность. Некоторые фразы и подписи к рисункам не очень понятны. Например, что значит подпись к рис. 2.6 (рис. 4 в автореферате) «Площадь взаимодействия рассчитана в количестве контактных атомов в противостоящих пиреновых остатках» или фраза «энергия испускания пирена и его эксимера в широком сине-зеленом диапазоне при резонансном переносе будет сконцентрирована в узкой полосе испускания $Su3$ с максимумом флуоресценции на 570 нм»? Сложно понять рис.

2.26 (рис. 17 в автореферате), поскольку непонятно, что означают цифры около спектров и, соответственно, какой спектр какому антителу соответствует. Однако понятно, что все указанные недочеты никоим образом не влияют на общее содержание работы, которая является высококлассным научным исследованием.

В заключение необходимо отметить, что диссертация Апарина является научно-квалификационной работой, в которой содержится несколько достаточно элегантных решений задач создания новых типов флуоресцентных олигонуклеотидных зондов и конъюгатов олигонуклеотидов с различными соединениями, включая белки. Работа полностью соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней", а сам Апарин достоин присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия. Подписано главным научным сотрудником отдела химии нуклеиновых кислот НИИ Физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ, Мариной Борисовной Готтих.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо, Владимир Александрович. Илья Олегович, ответьте, пожалуйста. В основном технические конечно замечания.

Апарин И.О.:

Хотел бы выразить благодарность Марине Борисовне Готтих за предоставленный отзыв. Он также был подробно проработан. Я бы хотел согласиться со всеми замечаниями, потому что действительно мне на них нечего ответить, и они имеют место быть. Да, это недочеты моей работы. Спасибо.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо. Уважаемые коллеги, дискуссия по обсуждению работы Апарина Ильи Олеговича открыта. Пожалуйста, у кого есть слово для выступления... Да, Лев Давыдович, пожалуйста.

Румш Л.Д.:

Хоть это и не близкая от меня тематика, но я представлял эту диссертацию на семинаре. И, конечно, очень благоприятное впечатление и тогда было оставлено и сейчас, когда был сделан доклад. Диссертация посвящена синтезу флуоресцентных ДНК-зондов на основе хиральных диолов, к которым присоединены азидопроизводные красителей, собственно, нуклеозидным последовательностям, которые позволяют определить ту или иную последовательность в генетическом материале. Очевидно, что эта работа, конечно, важна в анализе генетического материала, в геномике, в создании различных маркеров и поиске в медицинской диагностике. И в этом смысле, актуальность, конечно, не вызывает никаких сомнений. Работа имеет технологическое значение, но это очень важная работа,

потому что это по сути дела создание новых инструментов. А вот эти инструменты потом уже используются другими исследователями при всяких работах фундаментальных и новые инструменты зачастую позволяют делать открытия, потому что можно мерить, смотреть то, что не удавалось делать старыми инструментами. Работа очень большая и тщательно выполнена, красиво оформлена. Много замечаний было сделано, я думаю это как раз объясняется тем, что она большая по объему и невозможно было уложить туда все, что надо было объяснить оппоненту. Наверно много замечаний было от ведущей организации. Это все объясняет, но не оправдывает диссертанта, хотя, конечно, работа прекрасная, никаких сомнений у меня не вызывает присуждение ученой степени. Я поддерживаю и призываю остальных членов ученого совета голосовать «За». Хочется поздравить руководителя и диссертанта. Вообще, работа большая и, насколько я представляю диссертанта, человек очень увлеченный работой. У нас вообще все увлеченные, но этот, хочу отметить, особенно.

Ефремов Р.Г.:

Спасибо большое, Лев Давыдович. Коллеги, кто еще хотел бы выступить? Если больше желающих нет, тогда слово предоставляется соискателю. Пожалуйста, заключительное слово.

Апарин И.О.:

Я бы хотел выразить большую благодарность своему руководителю Андрею Альфредовичу Формановскому, который, к сожалению, сегодня не присутствует. Также огромную благодарность я выражаю Владимиру Аркадьевичу Коршуну, который внес огромный вклад в данную работу и в мое персональное руководство. Я бы хотел поблагодарить Ирину Владиславовну Михуру за огромную помощь в корректуре моей диссертации и детальный ее анализ, а также всех сотрудников лаборатории органического синтеза и группы биоконъюгации. Отдельно хочу поблагодарить Тимофея Зацепина, который всячески помогал нам в данной работе и всячески коллаборировал с нами. И, конечно же, это было бы несправедливо с моей стороны не поблагодарить людей, которые поддерживали все это время меня. Я бы хотел выразить огромную благодарность своим родителям, своей супруге и дочери, которые подбадривали и стимулировали меня к завершению данной работы и написанию диссертации. Спасибо вам большое!

(Далее объявляется перерыв на голосование. Проходит тайное голосование)

Ефремов Р.Г.:

Владимир Александрович, доложите, пожалуйста, о результатах голосования.

Олейников В.А.:

Счетная комиссия отработала... *(объявляет результаты работы счетной комиссии).*

Защита Апарина Ильи Олеговича на соискание степени кандидата химических наук. Присутствовало на заседании - 23 члена, роздано бюллетеней – 23, оказалось в урне бюллетеней – 23, «За» - 23, «Против» нет, недействительных нет.

Ефремов Р.Г.:

Уважаемые коллеги, предлагаю утвердить результаты голосования.
(Проходит голосование. Результаты работы счетной комиссии утверждены единогласно.)

Позвольте тогда поздравить соискателей с успешной защитой. Так, теперь, у всех имеется проект заключения диссертационного совета по диссертации. Пожалуйста, если у кого есть замечания, предложения, просьба высказать.

(Замечаний нет. Проходит голосование по проекту заключения совета. Заключение совета принято единогласно.)

Тогда на этом разрешите закрыть заседание диссертационного совета. Всем спасибо за плодотворную работу!

Заместитель председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремов

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. В.А. Олейников

