

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

**ИНСТИТУТ  
ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ  
И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ  
МЕДИЦИНЫ**

**СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ИХБФМ СО РАН)**

Просп. ак. Лаврентьева, 8, г. Новосибирск, 630090

тел. (383) 363-51-50

факс. (383) 363-51-53

E-mail: niboeh@niboeh.nsc.ru

http://www.niboeh.nsc.ru

**"УТВЕРЖДАЮ"**

Директор  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института  
химической биологии и  
фундаментальной медицины  
Сибирского Отделения РАН

чл.-корр. РАН Пышный Д. В.



*26.02.2018* № *15309-31-05/112*

На № \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ 2018 г.

## **ОТЗЫВ**

**ведущей организации на диссертацию Апарина Ильи Олеговича  
«Азидопроизводные красителей и нуклеозидные реагенты на основе  
хиральных 1,3-диолов для синтеза флуоресцентных ДНК-зондов»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук  
по специальности 02.00.10 - биорганическая химия**

Успехи в области фундаментальной молекулярной биологии и медицины, создание биосенсоров и разработка современных диагностических методов во многом основаны на использовании флуоресцентных зондов. В настоящее время флуоресцентные олигонуклеотидные зонды применяются в таких современных биотехнологиях и подходах как полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, визуализация НК в живых и фиксированных клетках, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), Саузерн- и нозерн-блот гибридизация, а также при разработке ДНК-микрочипов.

Работа Апарина И.О. 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. Синтез флуорофоров с заданными спектральными характеристиками, обладающих высокой яркостью, фотостабильностью и химической инертностью является нетривиальной задачей, при этом получение флуоресцирующего красителя с необходимыми параметрами совершенно не гарантирует возможность его успешного применения в качестве флуоресцентной метки в составе олигонуклеотидного зонда. С этой целью необходимо разработать или оптимизировать способ введения флуорофора, позволяющий количественно модифицировать олигонуклеотид, а перед

использованием полученного флуоресцентного олигонуклеотидного зонда исключительно важно оценить его эффективность в конкретном методе анализа, и уже после этого делать вывод о возможности его применения. Актуальность настоящей работы, в которой продемонстрирован потенциал использования азидопроизводных красителей и новых фосфитамидных нуклеотидных реагентов для получения флуоресцентных олигонуклеотидных зондов, не вызывает сомнений.

Основными задачами диссертационной работы являлись (1) разработка новых коротковолновых флуорофоров для мечения олигонуклеотидов с улучшенными флуоресцентными характеристиками и изучение их поведения в модельных экспериментах и на реальных объектах; (2) апробация нестандартной комбинации пиреновый эксимер/ $Cu_3$  в качестве высокоэффективной донорно-акцепторной пары флуорохромов для олигонуклеотидных зондов и изучение их взаимодействия и переноса энергии в составе зондов; (3) улучшение способов конъюгации олигонуклеотидов с флуоресцентными красителями, а также с иммуноглобулинами с применением методов «клик»-химии.

Для выполнения поставленных задач автором использованы методы современной органической химии и химии нуклеиновых кислот, флуоресцентная и УФ-спектроскопия, методы хроматографического анализа биополимеров. Продемонстрирован потенциал разработанных соискателем реагентов для синтеза флуоресцентных ДНК-зондов, пригодных для использования в методах флуоресцентной гибридизации и кПЦР.

Работа построена традиционным образом и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы.

Обзор литературы «Флуоресцентные ДНК-зонды» посвящен описанию каркас-модифицирующих реагентов для введения меток в состав олигонуклеотидных зондов, различных типов флуоресцентных меток и тушителей флуоресценции, используемых для создания зондов, а также рассмотрению ДНК-зондов для внутриклеточной визуализации *in situ* и *in vivo*. Особое внимание в обзоре уделено классификации флуоресцентных ДНК-зондов по структурным признакам и типам флуоресцентных меток. Эта часть диссертации иллюстрирована и содержит обобщающие таблицы, облегчающие восприятие материала. Обзор литературы изложен на 61 странице, при этом он опирается на 290 литературных источников.

Глава «Обсуждение результатов» является логическим изложением и анализом экспериментальных данных, хорошо проиллюстрирована рисунками и таблицами. Среди предложенных синтетических подходов большой интерес представляет использование азид-алкинового циклоприсоединения, не требующего присутствия медного катализатора (SPAAC), для присоединения азидмодифицированного иммуноглобулина к олигонуклеотиду. Протекание реакции в отсутствие солей  $Cu(I)$

достигается за счет фрагмента ацетилена в составе азидабензоциклооктина (ADIBO), введенного в состав олигонуклеотида. 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 ненуклеозидного каркаса на основе коммерчески доступного D-пантолактона для синтеза амидофосфитных синтонов и полимерных носителей. Полученные на его основе синтоны, несущие пиреновые и азобензольные хромофоры, успешно использованы для получения флуоресцентных олигонуклеотидных зондов типа «молекулярный маяк». Свойства таких зондов детально изучены, при этом выявлено влияние структуры биспиреновой метки на эксимерную флуоресценцию. Предложена и исследована FRET-пара пиреновый эксимер/СуЗ в составе двухкомпонентных ДНК-зондов на основе биспиренмеченых зондов типа «молекулярный маяк» и линейного зонда, содержащего СуЗ. Продемонстрирована перспективность использования таких конструкций для детекции ДНК-мишеней.

Другим интересным достижением является разработка и использование олигонуклеотидных зондов, содержащих 1-фенилэтинилпирен (PEPy) с высокой яркостью флуоресценции для «голубого» канала, для детекции ДНК методом ПЦР в режиме реального времени. Продемонстрировано его преимущество по сравнению с ранее использованными флуоресцентными метками для данного диапазона флуоресценции.

Автором получен целый ряд азидопроизводных флуоресцентных меток, а также биотина и холестерина. Отработаны условия твердофазной модификации 5'-алкиновых модельных олигонуклеотидов полученными азидопроизводными путем медь (I)-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения (Cu(I)AAC).

Эксперименты грамотно спланированы и скрупулезно описаны в экспериментальной части, что обеспечивает их воспроизведение. Все синтезированные соединения полностью охарактеризованы. Достоверность результатов не вызывает сомнений. Участие коллег в описываемых исследованиях четко оговорено в тексте диссертации.

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 3'- и 5'-конец 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 результатов 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 IgG в результате таких изменений в структуре?

По всему тексту диссертации мономерные синтоны для твердофазного амидофосфитного синтеза олигонуклеотидов называются автором фосфамидами или даже иногда амидиты, что относится к научным жаргонизмам.

В тексте диссертации содержится заметное количество опечаток и неудачных выражений (например, стр. 8, стр.10, стр.32, стр.38, стр.41, стр.93, стр. 98, стр.151(Выводы) и др.).

Приведенные замечания не снижают общего высокого уровня исследования, не влияют на теоретические и практические результаты диссертации и не изменяют общего положительного впечатления от рассматриваемой работы.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, так как они хорошо аргументированы и подтверждены экспериментальными данными, полученными с использованием современных методов проведения исследований, опубликованы в виде 5 статей в научных журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, и доложены на конференциях. Диссертация Апарина И.О. является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным автором самостоятельно на высоком научном уровне. Результаты работы могут представлять интерес для Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН и других организаций, занимающихся исследованиями в области биоорганической химии нуклеиновых кислот, а также в области молекулярной и клеточной биологии.

Диссертационная работа Апарина Ильи Олеговича соответствует требованиям «Положения о присуждении учёных степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а сам соискатель Апарин И. О., несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Отзыв на диссертационную работу Апарина И.О. подготовлен кандидатом химических наук (специальность 02.00.10) Новопашиной Дарьей Сергеевной. Отзыв обсужден и утвержден на межлабораторном научном семинаре Лаборатории химии РНК и Лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН (протокол № 1 от 20 февраля 2018 года).

Старший научный сотрудник  
Лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН,  
кандидат химических наук  
6300090, г.Новосибирск,  
просп. акад. Лаврентьева, 8, ИХБФМ СО РАН  
электронная почта: [danov@niboch.nsc.ru](mailto:danov@niboch.nsc.ru)  
рабочий телефон: +7 (383) 363 2951

Новопашина Д.С.

Подпись Новопашиной Д.С. заверяю  
Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН  
к.х.н.



Пестряков П.Е.