



Федеральное агентство научных организаций
(ФАНО РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@imb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

26.09.2018 № 12312-2171

На № _____ от _____

ОТЗЫВ

Официального оппонента о диссертации **Апарина Ильи Олеговича** «АЗИДОПРОИЗВОДНЫЕ КРАСИТЕЛЕЙ И НЕУКЛЕОЗИДНЫЕ РЕАГЕНТЫ НА ОСНОВЕ ХИРАЛЬНЫХ 1,3-ДИОЛОВ ДЛЯ СИНТЕЗА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ ДНК-ЗОНДОВ», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Методы исследований с использованием флуоресцентных олигонуклеотидных зондов занимают исключительное место в арсенале инструментов гибридизационного анализа. Важной особенностью этих методов является их востребованность как в фундаментальных исследованиях, так и в практической медицинской диагностике. В связи с этим разработка новых реагентов для синтеза флуоресцентных олигонуклеотидных зондов, а также изучение характеристик гибридизационных олигонуклеотидных конструкций представляет безусловный интерес. Актуальность и практическая значимость диссертационной работы Апарина И.О., посвященной синтезу реагентов для введения флуоресцентных красителей в олигодезоксинуклеотиды, исследованию новых флуоресцентных олигонуклеотидных зондов и разработке перспективных подходов к биоконъюгации, не вызывает сомнений. Заявленной целью работы является улучшение фотофизических параметров ДНК-зондов за счет использования новых флуоресцентных меток и оптимизации структуры самих олигонуклеотидных зондов, а также развитие методологии конъюгации олигонуклеотидов с помощью «клик»-реакций.

Диссертация Апарина И.О. изложена на 187 страницах, содержит 18 таблиц и 63 рисунка. Работа построена традиционно и включает введение, обзор литературы, экспериментальную часть, обсуждение результатов, выводы, список цитируемой литературы и приложения.

Обзор литературы рассматривает три аспекта флуоресцентного анализа, связанные с использованием олигонуклеотидных зондов – принципы конструирования зондов, типы зондов и особенности флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Заметное место в обзоре отведено флуоресцентным олигонуклеотидным пробам, содержащим пары донор-акцептор или донор-тушитель. Рассмотрены факторы определяющие эффективность олигонуклеотидных зондов – типы красителей и тушителей, наличие модификаций олигонуклеотида, строение линкеров и др. В обзоре представлены многочисленные варианты конструкций зондов, в частности молекулярные маяки, *Taqman* пробы и смежные зонды. В разделе, посвященном FISH, подробно рассмотрены подходы к усилению флуоресцентного сигнала. К очевидным преимуществам обзора следует отнести наличие ссылок на веб-ресурсы. Представленный в обзоре материал основан на анализе большого количества публикаций и представляет безусловный интерес для широкого круга исследователей, работающих с флуоресцентными олигонуклеотидными пробам.

В разделе «Осуждение результатов» автор представил результаты проведенных исследований. Первая часть раздела посвящена синтезу и исследованию молекулярных маяков и смежных проб на основе олигонуклеотидных шпилек, в которых реализована схема тушения флуоресценции в паре пиреновый эксимер-Dabsyl или FRET в паре пиреновый эксимер-Cy3. В ходе работ автором был осуществлен синтез амидофосфитных реагентов, содержащих остатки пиренкарбоновой, пиренуксусной кислот и тушителя Dabsyl, а также модифицированного Dabsyl носителя для твердофазного синтеза олигонуклеотидных зондов. Исследование флуоресцентных характеристик молекулярных маяков и их гетеродуплексов с мишенью позволило выявить ряд важных закономерностей и оптимизировать состав флуоресцентных проб. В частности, было показано, что эксимер P1P1 на основе пиренкарбоксамиды является наиболее ярким и стабильным. Далее автор рассматривает смежные олигонуклеотидные зонды на основе пиреновых эксимеров, в которых реализован принцип FRET в паре пиреновый эксимер- Cy3. Детальное исследование различных вариантов взаимного расположения эксимеров и Cy3 метки позволило выявить оптимальную конфигурацию смежных зондов, определить параметры FRET и ее эффективность.

Вторая часть раздела рассматривает синтез азидов ряда красителей для твердофазной модификации олигонуклеотидов. Одно из полученных соединений, азид фенилэтинилпирена (PEPy), было использовано для разработки новых зондов для кПЦР. Сравнительный анализ *Taqman* зондов на основе PEPy, AMCA и AlexaFluor 350 показал заметные преимущества новых зондов благодаря снижению фоновой флуоресценции, усилению конечной флуоресценции и снижению значений пороговых циклов в ПЦР.

Заключительная часть работы посвящена разработке метода ортогональной биоконъюгации белков с олигонуклеотидами на примере иммуноглобулина G. Принципиальной особенностью

нового подхода является наличие внутреннего флуоресцентного контроля эффективности модификации белка. Автором была разработана оригинальная схема функционализации белка с использованием линкера на основе красителя Cy5 для контролируемого введения азидогрупп в белки. Последующая биоконъюгация с олигонуклеотидом была реализована с помощью «клик» реакции без использования медных катализаторов.

Диссертация Апарина И.О. впечатляет объемом синтетической работы и разнообразием методов исследований. Получено большое число новых реагентов, представляющих огромную практическую ценность. Разработаны новые эффективные процедуры флуоресцентного гибридизационного анализа. Работу отличает уникальное сочетание фундаментального характера и практической направленности. 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 пяти статьях 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) В литературном обзоре отсутствуют ссылки на структуры, представленные на рисунке 1.2. На стр. 71 приведена фраза более уместная в разделе «Экспериментальная часть»: «После упаривания сухой остаток перетирали с водой и отфильтровывали, отделяя от пентафторфенола и амина».
- 2) В тексте диссертации не содержится четкого описания процедуры определения термической стабильности молекулярных маяков. Каким образом дифференцировали значения T_m для маяков и гетеродуплексов с мишенью? Не приводится состав компонента PCR-mix-2FRT и не разъясняется его роль в исследовании термической стабильности. С какой целью в раствор добавляли дезоксинуклеозидтрифосфаты? Какова концентрация маяка и комплементарной мишени? Не указан состав буфера.
- 3) При анализе распределения интенсивностей эксимерной, мономерной и фоновой флуоресценции (рис. 2.5) различия в термической стабильности маяков и их гетеродуплексов не принимаются в расчет. Однако этот параметр может заметно влиять на соотношение закрытых и раскрытых шпилечных структур, что отражается на распределении флуоресценции по спектральному диапазону. Кроме того, не указана температура в экспериментах по гибридизации маяков с матрицей Seq3 и по исследованию FRET для моделей, показанных на рисунке 2.8.

- 4) В тексте диссертации встречаются опечатки («гуанидиновые основания» вместо «гуаниновые» на стр. 10), неудачные выражения («Применение Taq полимеразы с рестриктазной активностью» на стр. 59), несогласованные предложения («...флуорофоры представляют плоские органические молекулы, испускающими в диапазоне...» на стр. 12) и необоснованные англицизмы («пермеабиллизация» вместо «транспорт», «проникновение» на стр. 4 или «фосфамидиты» вместо «амидофосфиты» на стр. 10 и далее).

Вышеприведенные замечания несколько не умаляют достоинств диссертационной работы. 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" (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), а сам диссертант, Апарин Илья Олегович, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Официальный оппонент

Ведущий научный сотрудник лаборатории дизайна и синтеза биологически активных соединений ФГБУН Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта

доктор химических наук



/Тимофеев Эдуард Николаевич/

26 февраля 2018 г.

Контактная информация:

119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Тел. (903) 227-67-50. E-mail: edward@eimb.ru

Подпись д.х.н. Тимофеева Эдуарда Николаевича удостоверяю

Ученый секретарь ИМБ РАН



/к.в.н. Бочаров А.А./