

ОТЗЫВ

**официального оппонента доктора химических наук Марины Борисовны Готтих
на диссертационную работу Апарина Ильи Олеговича
«Азидопроизводные красителей и нуклеозидные реагенты на основе хиральных
1,3-диолов для синтеза флуоресцентных ДНК-зондов»,
представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по
специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия»**

Работа И.О. Апарина посвящена оптимизации структуры олигонуклеотидных зондов и улучшению их фотофизических параметров за счет использования новых флуоресцентных меток. Кроме того в работе предложены новые эффективные методы конъюгации алкин-содержащих олигонуклеотидов с азидопроизводными различных красителей и некоторых биологически значимых лигандов, а также с иммуноглобулинами. Актуальность настоящей работы в первую очередь определяется важностью и широчайшим использованием технологий с применением флуоресцентных ДНК-зондов. Все современные технологии детекции нуклеиновых кислот - полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени, флуоресцентная гибридизация *in situ*, ДНК-микрочиповые технологии и другие – включают в себя стадию регистрации сигнала флуоресценции при гибридизации ДНК-зонда с комплементарной ему последовательностью. Основные требования к работе ДНК-зонда – его высокая чувствительность по отношению к заданной мишени, а также яркость флуоресцентного сигнала. Для того чтобы выполнить эти требования, чрезвычайно важно правильно подобрать структуру зонда: длину и последовательность нуклеотидов, выбор флуоресцентной метки и, при необходимости, гасителя флуоресценции, структуру линкеров для введения меток и, при необходимости, наличие неприродных модификаций олигонуклеотида. Основные принципы организации ДНК-зондов давно и хорошо разработаны, однако, для решения некоторых задач необходимы новые подходы к дизайну флуоресцентных зондов. Именно поэтому круг модифицированных мономеров для олигонуклеотидного синтеза и флуоресцентных маркеров непрерывно пополняется новыми соединениями. Кроме того, разрабатываются новые способы усиления флуоресцентного сигнала и новые подходы к улучшению соотношения полезный/фоновый сигнал зонда. Актуальной задачей является также синтез флуорофоров с заданными спектральными характеристиками, высокой яркостью, фотостабильностью и инертностью для инструментальных методов гибридизационных анализов: флуоресцентной микроскопии, ПЦР в реальном времени. Ценность работы И.О. Апарина как раз и

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 и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, обсуждение результатов, экспериментальную часть, в которой четко и подробно описаны многочисленные методики, использованные диссертантом в его работе, заключение, выводы и список литературы, а также приложения, содержащие таблицы и рисунки с дополнительными экспериментальными данными. Содержание диссертации полностью соответствует специальности.

Во введении очень четко и конкретно описаны актуальность исследования, его научная новизна, практическая ценность, а также 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 выбор направления исследований и значимость проделанной диссертантом работы. В обзоре рассматриваются основные принципы дизайна олигонуклеотидных зондов, приведена классификация флуоресцентных зондов, описаны их основные типы: молекулярные маяки, смежные зонды, TaqMan зонды, а также некоторые другие виды зондов. Отдельный раздел посвящен описанию зондов для флуоресцентной гибридизации *in situ*. Обзор очень информативный, он может быть интересен широкому кругу специалистов в области синтеза флуоресцентных производных олигонуклеотидов, а также в области анализа генетического материала при решении задач медицинской диагностики, геномики, агрохимии, вирусологии, молекулярной и клеточной биологии. 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. Пирен был выбран И.О. Апариним в качестве метки для зондов типа «молекулярного маяка», поскольку он способен образовывать эксимер, характеризующийся появлением дополнительной длинноволновой полосы в спектре испускания. Пиреновый эксимер имеет ряд полезных свойств, которые выделяют его среди прочих органических флуорофоров, однако, известно, что использование пиренового эксимера в качестве маркера для олигонуклеотидных зондов требует

детальной оптимизации структуры самой пиреновой метки и рационального дизайна зонда для улучшения флуоресцентных характеристик. С целью оптимизации структуры зонда, содержащего эксимер-образующий пиреновый маркер, И.О. Апариным разработан достаточно простой метод синтеза аминокдиола из коммерчески доступного D-(-)-пантолактона. Этот аминокдиол можно использовать в качестве каркаса для последовательного введения пиреновых остатков в олигонуклеотидный зонд. Разработанный метод позволяет быстро нарабатывать необходимый аминокдиол в две стадии в мультиграммовых количествах без хроматографической очистки. Далее на основе синтезированного аминокдиола И.О. Апариным были получены амидофосфиты, содержащие остатки пиренкарбоновой и пиренуксусной кислот, азобензольного тушителя Dabcyl, а также модифицированный носитель с этим же тушителем, и синтезированы зонды-молекулярные маяки, содержащие различные сочетания флуорофоров и тушителя. После гибридизации синтезированных молекулярных маяков с комплементарной матрицей были определены их фотофизические характеристики: относительное увеличение интенсивности флуоресценции при гибридизации с комплементарной матрицей и соотношение интенсивности флуоресценции на эксимерном и мономерном максимуме испускания пиренов. В результате этой работы И.О. Апариным было установлено, что можно влиять на величину длины волны испускания, Стоксова сдвига и интенсивности эксимерной полосы пиренового эксимера путем изменения состава пиреновой метки. Эксимер, образованный двумя остатками пиренкарбоновой кислоты, оказался самым стабильным и ярким из всех исследованных. Это важный результат, который позволяет теперь проводить рациональный дизайн пирен-содержащих зондов.

Интересным результатом, полученным И.О. Апариным при изучении пирен-содержащих зондов, является оптимизация системы смежных зондов на основе пиреновой пары и СуЗ. Надо отметить, что донорно-акцепторная пара флуорофоров - пиреновый эксимер и цианиновый краситель СуЗ – является нетривиальной и предложена в данной диссертации впервые. И.О. Апариным был детально изучен перенос энергии от пиреновой пары на СуЗ, и было показано, что только один тип возбужденного комплекса выступает донором энергии, в то же время перенос энергии от второго эксимерного состояния является запрещенным.

В рамках исследования возможностей использования производных пирена, И.О. Апариным впервые предложен 1-фенилэтинилпирен (PEPy) в качестве новой метки с высокой яркостью флуоресценции для «голубого» канала детекции кПЦР-амплификаторов. В работе проведено детальное сравнение поведения при

количественной ПЦР олигонуклеотидных зондов, содержащих PEру и стандартно используемый для «голубого» канала детекции 7-аминокумарин. Установлено, что при повышении температуры, квантовый выход флуоресценции PEру снижается значительно слабее, чем в случае 7-аминокумарина. По эффективности тушения флуоресценции азокрасителем Dabcyl оба флуоресцентных маркера оказались практически идентичны друг другу. Наконец, крайне важно, что по яркости флуоресценции PEру, как маркер зондов для количественной ПЦР, оказался предпочтительнее в сравнении с 7-аминокумарином и его сульфированным аналогом Alexa Fluor 350: яркость флуоресценции PEру превышала яркость 7-аминокумарина в среднем в 2 раза. Надо, однако, отметить, что 1-фенилэтинилпирен в составе олигонуклеотидных зондов оказался значительно более чувствителен к различным комбинациям соседних нуклеотидов. Этот эффект, несомненно, необходимо учитывать при дизайне зондов с этим красителем.

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 И.О. 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. Надо особо отметить, что реакция медь-катализируемого азид-алкинового циклоприсоединения проводилась И.О. Апариним в твердофазном варианте. Этот способ пост-синтетической модификации олигонуклеотидов является более производительным и простым в исполнении, чем вариант модификации в растворе, позволяет снизить время получения конъюгатов и повысить их выход за счет сокращения промежуточных этапов выделения. В работе были определены оптимальные условия твердофазной модификации олигонуклеотидов и показано, что оптимальным катализатором для циклоприсоединения оказался комплекс $CuI \times P(OEt)_3$, а растворителем – диметилацетамид. К сожалению, твердофазный вариант модификации с последующим деблокированием олигонуклеотида применим не для всех соединений. Именно по этой причине диссертанту не удалось получить этим методом конъюгат олигонуклеотида с производным кумарина. Конъюгаты с азидопроизводными других флуоресцентных красителей, биотина и холестерина были получены с высокими выходами.

Практическая направленность работы И.О. Апарина четко проявилась и в последней части диссертации, посвященной получению конъюгатов олигонуклеотидов

с иммуноглобулинами. Дело в том, что такие конъюгаты все более широко применяются в различных областях науки: антитела выступают направляющими молекулами для доставки терапевтических олигонуклеотидов внутрь живой клетки, олигонуклеотидный фрагмент в составе таких конъюгатов может служить праймером при проведении иммуно-ПЦР или линкером для иммобилизации антитела на твердой поверхности. Вместе с тем, методы получения конъюгатов олигонуклеотидов с белками явно недостаточно разработаны, а оценка эффективности конъюгации крайне затруднена. И.О. Апарин постарался решить все указанные проблемы и предложил новый метод присоединения олигонуклеотидов к белкам через линкер, содержащий флуоресцентный цианиновый краситель сульфо-Су5, который обладает высоким коэффициентом молярного поглощения в красной области, сравнимым с коэффициентом молярного поглощения полноразмерных антител человека в ультрафиолетовой области. Полосы поглощения белковых антител и Су5 сильно отстоят друг от друга в спектральном диапазоне, что позволяет количественно оценивать степень мечения антитела без дополнительных функциональных тестов и титрований. Предложенный линкер содержит на одном конце N-сукцинимидный эфир, который обеспечивает присоединение линкера к белку, а на другом конце азидогруппу для последующей реакции с олигонуклеотидом. Учитывая, что присутствие солей меди может привести к денатурации антитела и выпадению его в осадок, И.О. Апарин выбрал вариант азид-алкинового циклоприсоединения не требующий медного катализатора, при котором протекание реакции в отсутствие солей Cu(I) достигается за счет фрагмента ацетилена в составе напряженного восьмичленного цикла. Соответственно, в работе был синтезирован активированный эфир азидабензоциклооктина, который присоединялся к олигонуклеотиду, содержащему алифатическую аминогруппу. Каждая стадия такого многостадийного варианта конъюгации была детально отработана, и в результате И.О. Апарину удалось предложить метод присоединения олигонуклеотида к иммуноглобулину G человека в мягких условиях, не приводящих к денатурации белка. Надо отметить, что разработанный подход может быть использован для модификации других белков и биомолекул, а также, например, их иммобилизации на твердой поверхности и наночастицах.

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.

По теме диссертации опубликовано 5 работ в международных рецензируемых журналах и 5 тезисов. Публикации по итогам работы и автореферат в полной мере отражают основное содержание диссертации. Все выводы диссертации хорошо обоснованы и их достоверность не вызывает сомнений.

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 Су3 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 антители 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 И.О. 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 представляет собой целостное и завершённое научное исследование, выполненное на высоком экспериментальном уровне. Результаты работы изложены

чётко и ясно. Сделанные выводы обоснованы и подтверждаются полученными экспериментальными данными. По актуальности поставленных задач, научной новизне, объему выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертационная работа, представленная соискателем Апариным Ильей Олеговичем, полностью 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, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Официальный оппонент,
доктор химических наук, профессор,
главный научный сотрудник
отдела химии нуклеиновых кислот
Научно-исследовательского института
физико-химической биологии имени
А.Н.Белозерского Московского государственного
университета имени М.В.Ломоносова

 /Готтих М.Б./

специальность 02.00.10 – биорганическая химия
рабочий адрес: 119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 40
телефон: +7 495 939 5407
адрес электронной почты: gottikh@belozersky.msu.ru

Подпись заверяю
Директор НИИ физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В.Ломоносова
академик РАН



 /В.П.Скулачев/

22.02.2018