

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Гарафутдинова Равиля Ринатовича
«МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НОВЫХ АМПЛИФИКАЦИОННО-
ОПОСРЕДОВАННЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА НУКЛЕИНОВЫХ
КИСЛОТ», представленную на соискание ученой степени доктора
химических наук по специальности 1.5.4 — биохимия (химические
науки)

Начало 21 века можно охарактеризовать как время многочисленных открытий в области генетики. Полученные новые научные знания, в основе которых лежат исследования нуклеиновых кислот, во многом определяют современный этап развития Homo sapiens. Очевидно, что такие работы стали возможны только после разработки большого набора хорошо стандартизованных методов анализа ДНК и РНК, а также ферментов, модифицирующих данные молекулы. Из числа таких методов следует, в первую очередь, упомянуть полимеразную цепную реакцию (ПЦР), реакцию амплификации нуклеиновых кислот, предложенную в 1983 году американским биохимиком Кэри Муллисом. В настоящее время, особенно после ковида, о существовании этой реакции знает почти каждый житель нашей Планеты. На сегодняшний день ПЦР используется в различных практиках, включая медицину, ветеринарию, криминалистику, пищевую химию, а также активно используется в научно-исследовательской деятельности.

Широко практическое применение ПЦР совершенно не означает, что методы определения нуклеиновых кислот на основе ПЦР идеальны и не требуют усовершенствования. К сожалению, это далеко не так. Хорошо известно, что при проведении ПЦР довольно часто наблюдаются ложноотрицательные и ложноположительные результаты. К недостаткам ПЦР относится и характерный для этой реакции низкий коэффициент чувствительности, что понижает точность количественного определения исследуемых аналитов. Более того, данный метод анализа требует термоциклирования, что также является неким ограничивающим фактором, не позволяющий проводить анализ у постели больного и повышающий стоимость анализа.

В этой связи последние годы активно развиваются изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот, такие как петлевая изотермическая амплификация, метод катящегося кольца, реакция с полимеризацией и замещением, каталитическая сборка шпилек, реакция цепной гибридизации и др. С применением изотермической амплификации уже разработано большое число высокочувствительных и

высокоспецифичных методов анализа ДНК и РНК, хотя и эти методы также не свободны полностью от недостатков. С учетом вышесказанного, понятно, что диссертационная работа Гарафутдинова Р.Р., посвященная усовершенствованию известных способов амплификации и разработке новых методов анализа нуклеиновых кислот, является актуальной и практически значимой.

Диссертация Гарафутдинова Р.Р. написана в традиционной форме и содержит следующие главы: введение, экспериментальную часть, результаты и их обсуждение, выводы и список цитируемой литературы. Весь текст диссертации изложен на 321 странице. Автореферат полностью соответствует основному тексту диссертации.

В разделе «Введение» диссертант объясняет читателю, что он собирался делать, почему и зачем.

Литературный обзор написан хорошим языком и соответствует современному уровню исследуемого предмета изучения. В данном разделе представлена информация о таких методах амплификации нуклеиновых кислот как ПЦР, петлевая изотермическая амплификация и метод катящегося кольца; о процессах разрушения ДНК в естественных условиях и ее искусственной фрагментации, а также о свойствах молекул ДНК, влияющих на ее фрагментацию. Критически обозрены методы выделения короткоцепочечных ДНК и особенности их анализа. В этом разделе диссертации описана также проблема неспецифической амплификации нуклеиновых кислот, включая роль неспецифической активности ДНК-полимераз, структуры праймеров и ингибиторов/усилителей амплификации. В целом, литературный обзор информативен и существенно помогает понять авторские результаты.

Экспериментальная часть включает в себя список используемых химических соединений и аппаратуры, а также описанные методики проведенных экспериментов. Методики прописаны детально, что при необходимости позволит их воспроизвести другим исследователям. Данная часть диссертации оставляет очень приятное впечатление.

Изложение своих результатов работы диссертант начал с изучения процесса фрагментации молекул ДНК. Этот процесс был изучен по нескольким причинам. Во-первых, как хорошо известно, фрагментация ДНК протекает при длительном хранении в естественных условиях. Во-вторых, фрагментация ДНК может наблюдаться на первичных этапах в процессе ее выделения. И в-третьих, фрагментацию ДНК осуществляют направленно, например, при анализе подлинности пищевых продуктов. Во всех указанных

случаях при проведении ДНК-анализа требуются фундаментальные знания, как и почему разрушение ДНК протекает.

Механическая фрагментация двуцепочечных ДНК исследовалась автором под действием ультразвука. Им найдено, что исследуемая реакция зависит от нуклеотидного контекста. При этом было показано, что с более высокой скоростью расщепляются ДНК с равномерным распределением по последовательности и средней плотностью динуклеотидов 5'-CG-3', и эффективность разрушения ДНК усиливается с увеличением их длины и повышением ионной силы раствора. Отмечено, что двуцепочечные ДНК, размер которых менее 150-160 п.о., практически не подвергаются более глубокой фрагментации. Проведена также оценка роли метилирования ДНК (по цитозиновым остаткам) на эффективность фрагментации дцДНК по CpG-сайтам под действием ультразвука. Исследование показало, что УЗ-расщепление ДНК по метилированному CpG-сайту является более предпочтительным.

Последующий фрагмент работы был посвящен выбору (моделированию) праймеров при проведении ПЦР. Главным результатом этого исследования является демонстрация преимуществ использования "праймеров встык". Такое решение позволяет снизить время проведения ПЦР за счет сокращения продолжительности этапов денатурации, отжига и элонгации. Более того, это снижает температуру денатурации до 80°C с сохранением эффективности ПЦР. Не менее важны также находки, говорящие о том, что применение "праймеров встык" приводит к повышению специфичности и чувствительности ПЦР и понижению ее восприимчивости к действию ингибиторов. Совокупность полученных результатов привела к тому, что автору удалось обеспечить обнаружение РНК-мишеней и амплификацию разрушенной ДНК в условиях, при которых при использовании праймеров с традиционным расположением анализ не регистрировался.

Чрезвычайно хорошее впечатление оставляет большой фрагмент диссертационной работы, посвященный формированию неспецифических продуктов в ПЦР. Здесь автором продемонстрировано нежелательность комплементарности двух и более 3'-концевых олигонуклеотидов праймеров и что в отсутствие такой комплементарности удастся получить повышенную специфичность и чувствительность ПЦР. Предел обнаружения ПЦР с «правильными праймерами» равнялся единицам копий исследуемой мишени.

В последние годы в анализе нуклеиновых кислот активно используются ДНК-полимеразы с вытесняющей активностью. На основе их применения сконструированы оригинальные эффективные и практически значимые методы амплификации. К сожалению, данные ферменты катализируют не только целевую реакцию, но и побочные

реакции, в частности мультимеризацию ДНК, формируя разнообразные неспецифические продукты. Так как мультимеризация существенно мешает проведению амплификации, требуется детальное изучение механизма данной реакции.

Используя концепцию, высказанную Wang et al. о том, что мультимеризация при условии "дыхания" цепей начинается с образования циклической ДНК-структуры за счет изгиба свободных 3'-концов цепей ДНК-дуплекса и их отжига на противоположной цепи, Гарафутдинов Р.Р. в своей диссертации углубленно изучил данную побочную реакцию. В качестве контрольной реакции исследовалась реакция, где вместо линейной использовалась кольцевая ДНК. Следует отметить, что процесс формирования продуктов мультимеризации исследовался в присутствии различных ДНК-полимераз. Все приведенные в диссертации данные подтверждают верность вышеуказанного механизма. Более того, в работе было продемонстрировано, что добавление в реакционную смесь полиаспарагиновой кислоты или использование праймеров с фосфорилгуанидиновыми группами могут предотвратить образование продуктов мультимеризации. Обнаружено, что процесс мультимеризации также ингибируется, если в качестве кофактора Bst ДНК полимеразы используются не только катионы магния, но и катионы марганца. Полученные результаты чрезвычайно важны с практической точки зрения.

Мультимеризация является побочной реакцией, часто мешающей определению нуклеиновых кислот, который все исследователи стремятся подавить. В противоположность майнстриму Гарафутдинов Р.Р. попытался использовать мультимеризацию в биоанализе как индикаторную реакцию. Одним из результатов его исследования является разработка оригинального метода определения зрелых микроРНК, основанный на проведении мультимеризации. К преимуществам данного метода следует отнести отсутствия в схеме анализа реакции обратной транскрипции (как правда и во всех изотермических методах амплификации) и использования флуорогенных зондов. На основе мультимеризации предложен также способ обнаружения вирусных РНК.

Другой изотермический метод анализа, предложенный автором, был развит с учетом способности РНК-лигазы T4 образовывать одноцепочечные кольцевые структуры из разрушенных ультразвуком дцДНК. Хотя количество таких кольцевых ДНК было, как отмечается диссертантом, незначительное, все же оно было достаточным для проведения амплификационного метода катящегося кольца.

Помимо описанных выше изотермических методов амплификации нуклеиновых кислот внимание автора в качестве объекта исследования привлекла также петлевая изотермическая амплификация (LAMP), метод уже получивший довольно широкое

применение в практике. При проведении LAMP используется 4 или 6 праймеров, и их моделирование представляет определенные трудности, что ограничивает применимость данного метода. Поэтому компьютерная программа LAMPprimers iQ, разработанная Гарафутдиновым Р.Р. и позволяющая, в отличие от альтернативных программ, использовать протяженные нуклеотидные последовательности и задавать жесткие критерии при подборе LAMP-праймеров, является существенным вкладом в биоаналитику нуклеиновых кислот.

Хотя данная работа оставляет очень хорошее впечатление, она все же имеет и некоторые недостатки/шероховатости. После прочтения диссертации у меня появились следующие вопросы и предложения:

1. В своей диссертационной работе Гарафутдинов Р.Р. затронул очень большой список проблем, которые актуальны и на которые действительно требуется искать ответы. Часть решений приведено уже в этой работе. К сожалению, при написании диссертации автору не удалось в полной мере объединить все полученные результаты. Нынешний вариант диссертации мне скорее напоминает сборник интересных работ, чем одно единое исследование. Отсюда, я думаю, и такое невыразительное название диссертации, которое само по себе (без ее результатов) мало что говорит читателю.
2. Авторские результаты, представленные в диссертации, не противоречат концепции Wang о механизме инициации и проведения мультимеризации, что с большой долей вероятности позволяет надеяться, что именно таким образом и протекает данная реакция. Очень жаль, что автор не озаботился в прямую продемонстрировать наличие циклической ДНК-структуры (автор по не понятной мне причине эту структуру называет псевдоциклической!), которая является ключевым соединением в данном механизме. Более того, с моей точки зрения, здесь было бы уместно провести компьютерное моделирование возможности формирования циклической ДНК-структуры.
3. Формирования циклической ДНК-структуры в процессе мультимеризации по мнению автора протекает за счет комплементарного взаимодействия нуклеотидов 3'-конца ДНК-матрицы с нуклеотидами 3'-конца противоположной цепи. Очень жаль, что не были проведены эксперименты по замене нуклеотидов 3'-конца противоположной цепи, которые были бы здесь очень уместны в свете концепции проводимого исследования.
4. В своей работе автором предложен новый метод определения микроРНК (на примере Тае-miR159), основанный на применении РНК-лигазы T4 и формировании продуктов мультимеризации. Предел обнаружения данного метода равен 20 пМ. К сожалению,

автором в диссертации не проведено сравнение разработанного метода с уже известными. Если же это сделать, то заметим, что эта величина достаточна высокая. В настоящее время описано уже большое количество методов определения микроРНК с пределом обнаружения порядка нескольких фМ и ниже. Предлагаемый метод достаточно дорог, так как требует проведение фосфорилирования и использования двух ферментов. Кроме того, такой важный параметр для анализа микроРНК как специфичность требует дополнительных исследований, так как последовательности используемых в качестве аналитов сравнения Tae-miR5050, Tae-miR9662a, Tae-miR398-3p и Tae-miR167c-5p слишком разнятся от последовательности Tae-miR159. По этому вопросу о специфичности данного метода считаю пока открытым.

Сделанные мною выше замечания носят в большей степени рекомендательный характер, и, надеюсь, помогут диссертанту в будущих исследованиях. Сам же диссертационный труд я оцениваю чрезвычайно высоко.

Диссертационная работа «МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НОВЫХ АМПЛИФИКАЦИОННО-ОПОСРЕДОВАННЫХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ» по своей актуальности, новизне, объему, научной и практической значимости результатов полностью соответствует требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Гарафутдинов Равиль Ринатович, заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.4 — биохимия (химические науки).



И.Ю. Сахаров

Сахаров Иван Юрьевич, доктор химических наук (специальность 03.00.23 - биотехнология), Химический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», главный научный сотрудник
119991, Москва, Ленинские горы, 1, МГУ имени М.В. Ломоносова
E-mail: sakharovivan@gmail.com

