

## Отзыв официального оппонента

о диссертации Дюдеевой Евгении Сергеевны "Исследование свойств частично или полностью незаряженных фосфорилгуанидиновых аналогов олигодезоксирибонуклеотидов как зондов для анализа нуклеиновых кислот", представленной на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – "Биоорганическая химия."

Диссертационная работа посвящена изучению свойств частично или полностью незаряженных фосфорилгуанидиновых производных олигодезоксирибонуклеотидов, в том числе их субстратных свойств в реакции обратной транскрипции. Синтетические нуклеиновые кислоты, в том числе олигонуклеотиды, широко применяются в исследовательских и практических целях. Достаточно упомянуть медицинскую диагностику и молекулярную генетику на основе ПЦР и секвенирования, генную инженерию и методы редактирования генома, РНК-вакцины и генную терапию, создание искусственных клеточных систем. Изначально эти методы базировались на структурах природных нуклеотидов, но в последние десятилетия развивается направление синтеза модифицированных нуклеотидов, отличающихся от природных по строению, но сохраняющих некоторые из их базовых свойств и функций. Модификация структуры нуклеотидов направлена на улучшение полезных свойств конечных продуктов, например, на повышение сродства или избирательности олигонуклеотидов (ОлН) к комплементарным мишеням, увеличение стабильности ОлН к действию ферментов или реагентов, используемых для различных манипуляций. С другой стороны, нуклеиновые кислоты лежат в основе жизни на Земле и понимание того, как изменения в их структуре изменяют их свойства важно для понимания происхождения жизни и построения синтетических систем, обладающих свойствами живых.

Отрицательный заряд основной цепи нуклеиновых кислот является важным фактором, обуславливающим способность к взаимодействию с белками, полиаминами при разделении двойных цепей. Введение в нуклеотидную цепь незаряженных звеньев является перспективным способом модификации свойств

нуклеиновых кислот. Разработанные недавно фосфорилгуанидиновые олигодезоксирибонуклеотиды (ФГО) перспективны для введения незаряженных звеньев в олигонуклеотиды в виду хорошей совместимости с системами автоматического синтеза ОлН. Фактически, на стадии снятия защиты в ходе обычного синтеза добавляется гуанидиновый реагент и звено становится модифицированным. Вовлечение ФГО в практику генетических исследований и разработок требовало исследования свойств ФГО при различном содержании фосфорилгуанидиновых групп (ФГ) и оценке возможности использования ФГО в базовых реакциях: введение модифицирующих групп на конце цепи, использование в качестве праймеров и зондов для гомо- или гетерофазного обнаружения нуклеиновых кислот. Исследования, проводимые Е. С. Дюдеевой, посвящены именно этим крайне актуальным вопросам.

Диссертация построена по классической схеме, она состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа представлена на 144 страницах, содержит 62 рисунка и 13 таблиц. Библиография включает 124 литературных источников.

Обзор литературы посвящён методам синтеза ДНК (первая часть), включая синтез модифицированных электронейтральных аналогов (морфолиновых, пептидных, Р-алкилфосфонатных и ФГО). Во второй части обзора рассмотрено использование модифицированных ОлН в реакции обратной транскрипции и деплеции нуклеиновых кислот. Литературный обзор достаточно полный и критичный, основан, преимущественно, на англоязычных источниках.

Экспериментальная часть содержит описание реагентов и методов, использованных в работе. Некоторые экспериментальные детали представлены по мере изложения результатов работы.

В основной части диссертационной работы представлены новые результаты, полученные автором, а именно:

- особенности электрофоретического, масс-спектрометрического и хроматографического (на обращённой фазе) поведения ФГО в зависимости от числа и расположения электронейтральных звеньев;
- способность ФГО образовывать стабильные дуплексы с нативной комплиментарной цепью в условиях низкой, практически нулевой, ионной силы, что открывает новые возможности для использования ФГО для детекции нуклеиновых кислот;
- установлено, что наличие гидроксильной группы вблизи ФГ звена может вызвать его деградацию в условиях аммонолиза, предложен механизм реакции (анхимерное содействие);
- продемонстрирована способность ФГО выступать в роли праймера-затравки в реакции обратной транскрипции, в том числе с участием протяженной структурированной РНК-матрицы.
- осуществлена иммобилизация ФГО-зонда на твёрдый носитель, показано, что наличие отрицательного заряда на носителе препятствует взаимодействию зонда с мишенью при низкой ионной силе.

По тексту диссертации можно сделать следующие замечания:

1. Основная часть обзора (33 стр. из 46) посвящена методам синтеза ДНК и её аналогов, причём рассмотрение начинается с классических работ 1940-х годов, в некоторых случаях описываются детали синтетических методик (стр. 21). Непонятно, какое отношение имеет эта информация к теме диссертационной работы, учитывая, что тема не связана с разработкой методов синтеза олигонуклеотидов, диссертант получал их с использованием автоматического синтезатора по разработанным ранее протоколам. На мой взгляд, в литературном обзоре можно было бы привести максимум информации по химическим и физико-химическим свойствам как ФГ-олигонуклеотидов, так и вообще фосфорилгуанидиновой группы. Известно ли что-то об её гидролитической стабильности? Каковы её основность и центр протонирования?
2. При описании абсолютирования растворителей недостаточно фразы "стандартными методами", этих методов много, следовало кратко описать или

привести ссылки. На с. 54 и в других местах говорится о выдерживании в смеси водных растворов аммиака и метиламина без указания концентраций. На с. 55 и др. при описании времени реакций говорится "в течение ночи". Следовало более точно указывать время, особенно для случаев, когда возможны побочные реакции, например, гидролиз целевых продуктов.

3. При изучении электрофоретического поведения ФГО апробированы две концентрации SDS и одна концентрация мочевины, представлено всего три опыта, при этом качественного разделения ФГО не достигнуто. На мой взгляд, можно было более настойчиво оптимизировать условия электрофореза. В одном из опытов наблюдали лишние полосы, отнесённые к примесям гидролизованных ФГО. Но ведь на стадии синтеза проводилась хроматографическая очистка? Или это какое-то явление, связанной с ассоциацией ФГО? Наличие или отсутствие ассоциации в растворах ФГО можно было изучить с помощью динамического светорассеяния.

4. На с. 82 приведена электрофореграмма биотиновых ФГО и отнесение пятен делается на основе логических рассуждений. Может быть был смысл провести масс-спектрометрию пятен и получить окончательные результаты?

5. На с. 85 при обсуждении масс-спектра важное значение имеет заряд наблюдаемых ионов. А он не может быть установлен из изотопного расщепления пиков? На рис. 3.16 есть продукт IV с массой 664.8, которому в спектре приписан пик при 683.4. Это аддукт IV с чем-то?

6. В работе достаточно часто (и не очень успешно) применяется катионный краситель "StainsAll", который очевидно должен плохо работать на нейтральных или даже скорее основных соединениях. Не предпринимались ли попытки заменить этот краситель на что-то кислотное?

7. Для большинства терминов и сокращений в работе использованы русские аналоги. На этом фоне непонятно, почему олигонуклеотид сокращён как "ON"? И на с. 54 есть "V/V" имея в виду "по объёму"?

8. Защищаемых положений, как и выводов слишком много. При этом первое положение тривиально – очевидно и ожидаемо, что при замене аниона на гидрофобную группу возрастёт гидрофобность молекулы, что приведёт к

очевидным последствием в обращённо-фазной хроматографии. Второе положение также ожидаемо, уменьшение числа ионогенных групп в молекуле должно приводить к уменьшению разнообразия ионов в масс-спектре. Третье положение, касающееся спектра поглощения ФГО, вероятно следует из спектральных данных мономеров. В целом, изложенное в первых трёх положениях представляет интерес, но отнюдь не в сравнении с действительно новыми и важными данными из положений 4-7. На мой взгляд, второй вывод не совсем соответствует полученным результатам, на данном этапе рано говорить о наличии подхода к электрофоретическому анализу ФГО (см. замечание 3).

9. Можно ли на основе опыта и сведений, имеющихся у автора, судить об устойчивости ФГО в сравнении с обычными ОН к действию pH и температуры?

Данные замечания не являются принципиальными и не снижают общей высокой оценки работы. Диссертация представляет собой законченное исследование, имеющее, тем не менее, большой потенциал для развития в областях биоорганической химии, молекулярной биологии, медицины и биотехнологии. Работа написана хорошим языком, полученные выводы закономерно следуют из экспериментальных данных. Автором продемонстрировано прекрасное владение методами эксперимента в биоорганической химии, способность планировать и обсуждать эксперимент на самом высоком уровне. Полученные результаты представляют несомненный интерес для таких Приоритетных направлений развития науки, технологий и техники в РФ как Науки о жизни, Индустрия наносистем, а также ряда критических технологий: Биокаталитические, биосинтетические и биосенсорные технологии; Биомедицинские и ветеринарные технологии; Геномные, протеомные и постгеномные технологии; Нано-, био-, информационные, когнитивные технологии; Технологии биоинженерии; Технологии снижения потерь от социально значимых заболеваний.

Материал диссертационной работы в полной мере отражён в автореферате и публикациях в ведущих рецензируемых научных журналах.

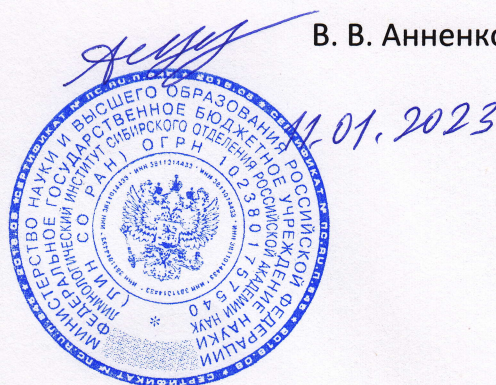
Диссертация отвечает требованиям, установленным Институтом химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, так как вносит значительный



вклад в создание новых средств генной диагностики и терапии, обогащает наши знания о химии и физико-химии нуклеиновых кислот и их аналогов. Работа выполнена на высоком, по мировым меркам, научном уровне, результаты достоверны, выводы обоснованы. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.4.9 — «Биоорганическая химия», а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Таким образом, соискатель Дюдеева Евгения Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 — «Биоорганическая химия»."

Заместитель директора по науке  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Лимнологического института Сибирского  
отделения Российской академии наук (ЛИН  
СО РАН), д.х.н., профессор



В. В. Анненков

664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3  
тел. +7-9148982577  
e-mail: annenkov@lin.irk.ru