

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Дюдеевой Евгении Сергеевны «Исследование свойств частично или полностью незаряженных фосфорилгуанидиновых аналогов олигодезоксирибонуклеотидов как зондов для анализа нуклеиновых кислот», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биорганическая химия

Практически любое современное исследование, так или иначе связанное с изучением живых систем и их генетического материала, требует использования синтетических аналогов нуклеиновых кислот с управляемыми свойствами. В зависимости от типа используемого подхода модификация синтетического олигонуклеотида должна обеспечивать альтернативную электроотрицательность или гидрофобность, устойчивость к действию конкретных растворителей и pH среды или увеличивать стабильность комплексов с нативными нуклеиновыми кислотами. В этой связи уменьшение заряда синтетического олигонуклеотида является перспективной стратегией для разработки инструментов анализа смесей, содержащих большой набор нуклеиновых кислот. На сегодняшний день предложено несколько вариантов структур производных олигонуклеотидов с альтернативной электроотрицательностью, однако все они имеют определенные недостатки, касающиеся, в том числе, деталей химического синтеза, вследствие чего не нашли широкого распространения в практике. Синтез предложенных недавно фосфорилгуанидиновых производных олигодезоксирибонуклеотидов относительно прост и может быть реализован в автоматическом режиме. Таким образом, основная цель представленной диссертационной работы, заключающаяся в исследовании физико-химических и субстратных свойств частично или полностью незаряженных фосфорилгуанидиновых производных олигодезоксирибонуклеотидов, представляется весьма актуальной.

Для достижения поставленной цели автор использует современные физико-химические подходы – методы термической денатурации и масс-спектрометрии, а также реакцию обратной транскрипции. Применение методов термической денатурации позволяет оценить стабильность гомо- и гетеродуплексов в растворах с разной ионной силой, что актуально для использования олигонуклеотидных производных в молекулярно-биологических приложениях. Реакция обратной транскрипции позволяет оценить перспективность использования синтетических производных в качестве праймеров для разных видов ПЦР.

Работа Дюдеевой Евгении Сергеевны изложена на 144 страницах, содержит 62 рисунка, 13 таблиц, список цитированной литературы включает 124 источника. Текст оформлен в традиционном стиле и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов,

результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и терминов, списка цитируемой литературы, рисунков и таблиц.

Введение описывает актуальность представленной научной работы, ее цели и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, положения, выносимые на защиту, а также личный вклад соискателя.

Обзор литературы разбит на две смысловые части, одна из которых посвящена описанию структуры, методов получения и свойств известных на сегодняшний день электронеутральных аналогов олигонуклеотидов, а вторая – обсуждению возможности их использования для анализа нуклеиновых кислот. В целом литературный обзор написан грамотным научным языком. Тем не менее, несколько избыточным кажется подробное описание исторической ретроспективы развития химических методов синтеза морфолиновых, пептидо-нуклеиновых и Р-алкилфосфонатных аналогов нуклеиновых кислот.

Раздел «Материалы и методы» содержит детальное описание классических химических и современных физико-химических методов, использованных в работе. Для стороннего наблюдателя не составит труда воспроизвести большую часть экспериментов по описанным методикам.

При изложении полученных результатов автор придерживается порядка поставленных в работе задач и последовательно описывает: изменение хроматографических, спектрофотометрических, масс-спектрометрических параметров и гибридизационных характеристик олигодезоксирибонуклеотидов при вариации числа и взаимного расположения в них фосфорилгуанидиновых групп, введенных по межнуклеотидному атому фосфора; предположительный механизм, объясняющий нестабильность продукта химического синтеза производных олигонуклеотидов, содержащих на 3'-конце фосфорилгуанидиновую группу и линкер с нуклеофильным заместителем; возможность использования модифицированных олигонуклеотидов в качестве праймеров в реакции обратной транскрипции, катализируемой M-MuLV H⁺, при синтезе по коротким гомо- и гетерополимерным матрицам, а также по участку 18S рРНК человека; результаты экспериментов по подбору условий, обеспечивающих сорбцию фосфорилгуанидиновых олигодезоксирибонуклеотидов на разные типы полимерных носителей. В результате проделанной работы были получены производные олигодезоксирибонуклеотидов с различным количеством фосфорилгуанидиновых групп, расположенных по межнуклеотидному атому фосфора. Обнаружено, что уменьшение общего отрицательного заряда модифицированных олигонуклеотидов приводит к ограничению количества молекулярных ионов, обнаруживаемых в режиме детекции полианионов с помощью масс-спектрометрии. Предложен механизм деградации олигонуклеотида, содержащего фосфорилгуанидиновую группу в непосредственной близости от нуклеофильного заместителя. Впервые показано, что термическая стабильность ДНК-дуплексов, сформированных одной полностью

модифицированной и одной немодифицированной цепью, практически не зависит от ионной силы раствора. Впервые показана возможность использования частично модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов в качестве праймера в реакциях, катализируемых обратной транскриптазой M-MuLV H⁻. Подобраны условия иммобилизации электронейтральных производных на поверхность BrCN-активированной сепарозы.

Несмотря на достаточный объем результатов и несомненные достоинства работы, при прочтении этой главы диссертации возник ряд вопросов, часть из которых носит технический характер.

На рис. 3.19, стр. 91, не обозначен маркер электрофоретической подвижности целевого продукта, в связи с чем не совсем понятно, какая именно из полос соответствует полноразмерному продукту реакции.

На стр. 92 сказано, что увеличение числа фосфорилгуанидиновых групп в составе праймера приводит к снижению степени накопления флуоресцентного продукта ОТ-реакции, однако количественные данные не приведены, поэтому проследить конкретные корреляции затруднительно.

Не вполне понятно, как учитывали влияние ионной силы раствора и изменения концентрации ионов магния на каталитическую активность фермента в экспериментах с использованием 18S рРНК в качестве матрицы в ОТ-реакциях (стр. 94).

Из описания к рисунку рис. 3.22, стр. 95, неясно, какие именно пробы были нанесены в дорожки 1, 4, 7 и 10 для разделения в агарозном геле – только ДНК-праймер, ДНК-праймер или частичный ДНК/РНК-гибридный дуплекс после деградации РНК в щелочных условиях? Кроме того, в описании эксперимента отсутствуют какие-либо статистические данные (рис. 3.23, стр. 97).

На рис. 3.24, стр. 98, не приведены положения маркеров, однако они упоминаются при описании эксперимента. Кроме того, хотелось бы уточнить, что именно подразумевает автор под термином "основной продукт" и каким образом был рассчитан его выход (рис. 3.25, стр. 99). Также в описании этих экспериментов отсутствуют какие-либо статистические данные.

На стр. 103 при описании результатов эксперимента по исследованию выхода продукта ОТ-реакции от концентрации гетеродуплекса и фермента в реакционной смеси автор говорит об эффективности этого процесса. Однако кинетические параметры ОТ-реакции в эксперименте не определяли; количественных данных о выходах продуктов реакции также не приведено. Кроме того, не вполне понятно, какие именно критерии лежат в основе определения механизма синтеза ДНК, катализируемого M-MuLV H⁻, по виду электрофореграммы.

На стр. 105 приведено сравнение результатов экспериментов по изучению выхода продуктов ОТ-реакции от концентрации фермента (рис. 3.27) и кинетики накопления ОТ-продукта

(рис. 3.28). Однако постановка этих экспериментов не позволяет провести прямое сравнение результатов, а количественные данные не приведены.

Количественные данные к эксперименту, результаты которого представлены на рис. 3.30, стр. 110, украсили бы работу.

Несмотря на приведенный список вопросов, в целом интерпретация результатов, предложенная автором, логична и аргументирована, выводы обоснованы и соответствуют полученным результатам.

В работе имеются орфографические ошибки, неудачные выражения и стилистические неточности, что не снижает общей ее ценности и не влияет на окончательную оценку

Подводя итог, без сомнения можно сказать, что результаты представленной работы являются важным шагом в изучении проблемы синтеза и использования модифицированных олигодезоксирибонуклеотидов. Экспериментальные данные представляют значительную ценность для биоорганической химии, молекулярной биологии и смежных наук. Основные результаты работы опубликованы в виде 4 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и РИНЦ, а также в виде 3 тезисов докладов.

Содержание автореферата соответствует основным положениям, выносимым на защиту.

Таким образом, диссертационная работа Дюдеевой Евгении Сергеевны «Исследование свойств частично или полностью незаряженных фосфорилгуанидиновых аналогов олигодезоксирибонуклеотидов как зондов для анализа нуклеиновых кислот», представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия, является законченной и соответствует всем требованиям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук. Диссертация оформлена в соответствии с приложениями №5 и 6 Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, а ее автор Дюдеева Евгения Сергеевна, безусловно, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

Белоусова Екатерина Анатольевна,

к.х.н., с.н.с. лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН), 630090 г. Новосибирск, пр-т академика Лаврентьева, д.
8. Тел.: +7 (383) 363-51-96, e-mail: rina@niboch.nsc.ru;

Подпись Белоусовой Е.А. заверяю

Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН, к.х.н.



11 января 2023 г

Новопашина Д.С.