

"УТВЕРЖДАЮ"

Директор федерального государственного бюджетного учреждения "Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства",
д.б.н., академик, профессор В.М. Говорун



25 мая 2017 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации федерального государственного бюджетного учреждения "Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства" о диссертационной работе Крашенининой Ольги Алексеевны «НОВЫЕ ПИРЕНИЛЬНЫЕ ЭКСИМЕР-ОБРАЗУЮЩИЕ ЗОНДЫ НА ОСНОВЕ ОЛИГО(2'-О-МЕТИЛРИБОНУКЛЕОТИДОВ) ДЛЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИИ РНК», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Достижения современной молекулярной медицины и биологии, развитие диагностических методов и создание биосенсоров во многом основаны на использовании флуоресцентно-меченых олигонуклеотидов. Работа Крашенининой Ольги Алексеевны посвящена созданию новых пиренильных эксимер-образующих зондов на основе олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) и их применению для флуоресцентной детекции РНК. Интерес к олигонуклеотидным производным пирена связан, в первую очередь, со способностью пиренильных заместителей формировать в составе фрагментов полинуклеотидов и их комплементарных комплексов эксимеры/эксиплексы, а также с чувствительностью флуоресценции пирена к локальному окружению. Основное препятствие к использованию пиренильных зондов в диагностических системах состоит в перекрывании спектров испускания флуоресценции мономерного пирена с автофлуоресценцией клеток. Создание предложенных в настоящей диссертации эксимер-образующих зондов позволяет не только достоверно дифференцировать их флуоресцентный сигнал, но дает новые возможности в конструировании молекулярных исследовательских инструментов.

Поэтому не вызывает сомнений актуальность настоящей работы, в которой разработаны универсальные подходы к получению пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов, изучены их свойства и продемонстрирована перспективность применения.

Автор формулирует следующие основные задачи исследования:

- Разработать метод синтеза конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) с одиночными и множественными 2'-биспиренильными группировками. Синтезировать ряд зондов, комплементарных РНК гена множественной лекарственной устойчивости (*mdr1*) и исследовать их физико-химические и биологические свойства.
- Оптимизировать структуру тандемных зондов, содержащих два монопиренильных остатка на стыке компонентов тандема комплементарного участку 28S рибосомальной РНК.
- Разработать структуру олигонуклеотидных зондов типа «молекулярный маяк», содержащих концевые биспиренильную группировку и гаситель ВНQ1 на примере олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), комплементарных участкам 28S рибосомальной РНК.
- Исследовать возможность использования новых зондов для детекции протяженных РНК в растворе и визуализации внутриклеточных РНК.

Следует отметить, что для выполнения поставленных задач применялся широкий набор методов, в том числе, приемов органического синтеза, спектрального, хроматографического и электрофоретического анализа биополимеров. Автором были интерпретированы результаты молекулярного моделирования и молекулярной динамики, работы с фиксированными клетками и др., что свидетельствует о высокой квалификации диссертанта.

Работа построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, изложения результатов и их обсуждения, экспериментальной части, заключения, выводов и списка цитируемой литературы.

Хорошее впечатление оставляет литературный обзор «Флуоресцентные биосенсоры на основе пиренильных конъюгатов олигонуклеотидов», посвященный обстоятельному анализу методов синтеза пиренильных производных олигонуклеотидов и перспективам их использования в биоаналитике.

Глава «обсуждение результатов» работы отличается ясным логическим изложением, квалифицированным анализом экспериментальных данных, написана в хорошем

стиле, подробно и убедительно проиллюстрирована рисунками и таблицами. Среди предложенных синтетических подходов наибольший интерес представляет универсальная синтетическая стратегия, основанная на элегантном решении о локальном введении в процессе элонгации 2'-*O*-TBDMS мономеров рибонуклеотидного синтеза в состав 2'-*O*-метилрибонуклеотидов. Такой подход позволяет избирательно удалять 2'-*O*-защитные группы и проводить реакции с гидроксилами этих звеньев. Однако, для создания эффективного метода на этой основе автору пришлось решать такие задачи, как синтез нуклеозидполимеров на стабильной в условиях деблокирования полистирольной основе и др. В результате разработанный метод позволил: синтезировать 2'-фосфорилированные олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды) без использования предварительно синтезированных модифицированных нуклеотидных синтонов; ввести два остатка пирена в 2'-положение нуклеозида (U, C, A или G) через 2'-фосфат; получить мультипиренильные конъюгаты олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащие несколько 2'-биспиренильных группировок. Дополнительно для повышения устойчивости зондов к биodeградации использовалось введение 3'-концевого «инвертированного» тимидина.

Среди новых научных результатов диссертации необходимо отметить создание на основе пиренильных конъюгатов олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов) новых сиквенс-специфичных эксимер-образующих флуоресцентных зондов трех типов (линейные, тандемные и зонды типа «молекулярный маяк») для детекции РНК. В результате исследований были найдены высокочувствительные зонды оптимального строения, связывание которых с РНК-мишенью вызывает появление специфического флуоресцентного сигнала эксимера пирена. На основе данных о термической стабильности комплексов зондов с НК-мишенями и, в случае тандемных зондов, данных молекулярно-динамических расчетов проведен детальный анализ структуры этих комплексов. Продемонстрирована применимость линейных зондов для детекции протяженной РНК в растворе на примере 678-звенного 5'-концевого фрагмента PGY1/MDR1 мРНК. Показана применимость тандемных зондов и зондов типа «молекулярный маяк» для визуализации внутриклеточной РНК на примере 28S рибосомальной РНК в фиксированных клетках линии HEK293 Phoenix.

Общие замечания и вопросы.

1. В таблице 2.2. «Последовательности и выходы синтезированных 2'-фосфорилированных олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидов), содержащих «инвертированный» тимидин на 3'-конце», стр. 73 найденное значение для

олигомера 1L3p m/z (6310.9 D) соответствует скорее аддукту олигомера с ионом лития, а не его молекулярному иону (6303.4 D).

2. На стр. 76 написано: «Введение четырех или шести пиренильных остатков резко увеличивает гидрофобность олигонуклеотида, вследствие чего конъюгат необратимо связывается с сорбентом хроматографической колонки». Причем, в работе почему-то использовался только один тип колонок – C18 (стр. 136). При этом перед MALDI TOF анализом «предварительно проводили обессоливание олигонуклеотидов на картриджах ZipTip C18» (стр. 135). Неудивительно, что «в некоторых случаях не удалось получить хорошие масс-спектры 2'-биспиренильных конъюгатов олиго(2'-O-метилрибонуклеотидов), содержащих два или три 2'-биспирен-модифицированных звена в цепи» (стр.78.).
3. В работе продемонстрирована успешная визуализация внутриклеточной 28S рРНК с использованием тандемных 5'-биспиренильных тандемных зондов и олигомера MB1 типа «молекулярный маяк» в фиксированных клетках линии НЕК293. Осталось не вполне ясным, в чем состоят преимущества каждого из этих способов? Зонды оказались эффективными при выявлении высокопредставленной 28S РНК. Как можно оценить чувствительность биспиренильных зондов в сравнении с известными флуорофорами и перспективы их применения для детекции низкокопийных РНК?

Приведенные замечания не снижают общего высокого уровня исследования, не влияют на теоретические и практические результаты диссертации и не изменяют общего положительного впечатления от рассматриваемой работы.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, так как они хорошо аргументированы и подтверждены экспериментальными данными, полученными с использованием современных методов проведения исследований, опубликованы в 4 научных статьях, доложены на конференциях.

Выводы к работе соответствуют поставленным цели и задачам, подкреплены подробным описанием собственных экспериментов. Результаты проиллюстрированы графиками, схемами и рисунками.

Диссертация Крашенининой О.А. является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным автором самостоятельно на высоком научном уровне.

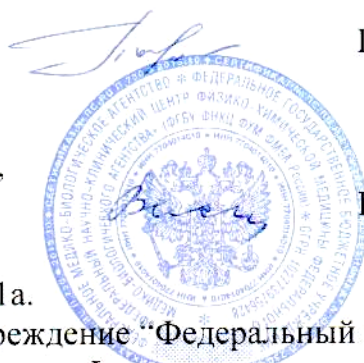
Результаты работы могут представлять интерес для Института биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Института

бюджетного образовательного учреждения высшего образования “Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова”, Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и других организаций, занимающихся исследованиями в области химии и свойств нуклеиновых кислот.

Считаем, что рассматриваемая диссертационная работа по поставленным задачам, уровню их решения, актуальности и научной новизне полученных результатов полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года №842), предъявляемых к кандидатским диссертациям, так как в работе решена научная задача, представляющая существенный интерес для создания эффективных молекулярно-биологических инструментов исследования нуклеиновых кислот, а её автор, Крашенинина Ольга Алексеевна, заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Отзыв на диссертационную работу Крашенининой О.А. подготовлен доктором химических наук (специальность 03.00.03), профессором Позмоговой Галиной Евгеньевной (119992, г.Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, ФГБУ ФНКЦФХМ ФМБА, электронная почта: rozmg@gmail.com, тел. +7 (499) 246-4570, +7 (499) 246-9646). Отзыв обсужден и утвержден на межлабораторном научном семинаре Отдела биофизики ФНКЦ ФХМ от 22 мая 2017 года, протокол № 6.

Зав. лабораторией искусственного антителогенеза
ФГБУ ФНКЦФХМ ФМБА,
доктор химических наук, профессор



Позмогова Г.Е.

Подпись Позмоговой Г.Е. заверяю
Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦФХМ ФМБА,
к.б.н.

Васильева Л.Л.

119992, г.Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а.
Федеральное государственное бюджетное учреждение “Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства” (ФГБУ ФНКЦФХМ ФМБА)
+7 (499) 2469646