



MASSEY UNIVERSITY
COLLEGE OF SCIENCES
TE WĀHANGA PŪTAIAO

Scientific Secretary of
The Dissertation Council D 003.045.01
Dr. Koval V.V.
Institute of Chemical Biology and
Fundamental Medicine,
Russian Acad. Sci., SB
Lavrentiev av, 8
630090 Novosibirsk-90
Russia

Dr. Vyacheslav V. Filichev
Associate Professor in Chemistry
Institute of Fundamental Sciences
Science Tower B, Level 4, room ScB4.11
Colombo Road, Turitea campus,
Massey University
4412 Palmerston North,
New Zealand
Tel.: +64 (6) 356 9099 extn 84659
Fax: +64 (6) 350 5682
E-mail: v.filichev@massey.ac.nz

ОТЗЫВ

об автореферате диссертации 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

Синтез и изучение свойств флуоресцентных меток в структуре олигонуклеотидов является актуальной задачей в современной биоорганической химии. Перспективность данных исследований обусловлена возможным использованием подобных конъюгатов в *in vitro* и *in vivo* диагностике. Можно с уверенностью констатировать, что данные исследования найдут свое применение в молекулярной биологии, биотехнологии и медицине.

Автор настоящего диссертационного исследования сосредоточил свои усилия на создании и изучении свойств новых эксимер-образующих флуоресцентных зондов для специфичной детекции РНК-мишеней. В данном контексте было предложено и успешно апробовано три типа зондов: линейные, тандемные и зонды типа «молекулярный маяк». Два последних типа были успешно использованы в визуализации 28S рРНК в фиксированных клетках.

Ключом к успеху данной работы явилась синтетическая часть, в которой различные пирен-содержащие олигонуклеотиды были получены и охарактеризованы. Весьма элегантно является синтетическая схема введения пиренильных фрагментов в 2'-позицию РНК через дополнительный фосфат (Схема 1 и 2 автореферата). Следует отметить, что данная стратегия позволила украсить олигонуклеотид шестью пиренами (Таблица 1). Возникает вполне логичный вопрос о выходах данных конъюгатов, их очистке и растворимости в водных растворах. Однако Схема 2 автореферата выглядит странно. Каким образом моноактивированный 2'-О-фосфат приводит к биспиренильному фосфату? Почему межнуклеотидные фосфаты не участвуют в этой реакции и каким образом 2'-О-Метилрибонуклеотид был растворен в абсолютном ДМСО? Тем не менее, для синтезированных линейных

зондов было отмечено многократное увеличение эксимерной флуоресценции (до 21 раза) при образовании комплексов с комплементарными РНК, что весьма полезно в детекции РНК. К сожалению, я не нашел в автореферате упоминание о спектрах кругового дихроизма, которые могли бы указать на ориентацию и взаимодействие пиренов в данных комплексах. В части работы, посвященной тандемным зондам, были найдены интересные закономерности стабильности комплексов (стр. 10-11 автореферата) и выявлено, что наиболее перспективным для визуализации РНК являются зонды с самым коротким линкером, так как это приводит к наиболее интенсивной эксимерной флуоресценции пирена. Это вполне логичный вывод из-за того, что расстояние между двумя зондами в комплексе с РНК минимально (Рис. 2 автореферата). Рассматривал ли автор тандемные зонды, которые связываются с РНК на некотором расстоянии друг от друга (2-3 нуклеотида)? В зондах типа «молекулярный маяк» на основе 5'-биспиренильных конъюгатов было показано, что ВНQ1 является эффективным тушителем флуоресценции пирена не только в нераскрытом «молекулярном маяке», но и в комплексе с РНК. Эксимерная флуоресценция пирена возникала только в случаях, когда 5'-биспиренильная группа находилась в непосредственной близости к дуплексу и таким образом защищена от удаленного тушения ВНQ1, находящегося в 3'-позиции.

Несомненным успехом работы является демонстрация применения биспирен-модифицированных олигорибонуклеотидов для визуализации внутриклеточной РНК *in situ*. Интересно, что сигнал флуоресцентного отклика был детектирован не только в цитоплазме, но и в ядрах клетки.

В целом работа производит положительное впечатление. Следует отметить безупречную логику в изложении проведенных экспериментов и обсуждении результатов.

Диссертационная работа выполнена на актуальную тему, содержит необходимые элементы научной новизны и практической значимости и соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней». Основные результаты работы прошли апробацию на конференциях и опубликованы в российских и зарубежных рецензируемых научных журналах.

Крашенинина О. А. заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Ассоциативный профессор института фундаментальных наук,

Университет Мэссей, Новая Зеландия, к.х.н.

27 июня 2017 г.

Филичев Вячеслав Владимирович

Institute of Fundamental Sciences
MASSEY UNIVERSITY
PRIVATE BAG 11-222
PALMERSTON NORTH
NEW ZEALAND