

ОТЗЫВ

**официального оппонента о 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**

Олигонуклеотиды, содержащие флуоресцентные красители, широко используются для детекции нуклеиновых кислот в растворе, визуализации их в клетке, а также при проведении полимеразной цепной реакции в режиме реального времени и при секвенировании НК. Флуоресцентными свойствами обладает большое количество органических соединений, но далеко не все из них можно использовать для присоединения к олигонуклеотиду при создании флуоресцентных зондов. Несмотря на наличие большого разнообразия коммерчески доступных красителей и НК-зондов на их основе, по-прежнему необходимыми являются исследования, направленные на конструирование новых инструментов, обладающих большей специфичностью и чувствительностью по отношению к мишени, а также простотой их синтеза. Таким образом, диссертационная работа Крашенининой О.А., посвященная разработке простых универсальных подходов к получению модифицированных олигонуклеотидов, содержащих остатки пирена в заданных положениях олигонуклеотидной цепи, для эффективной и специфичной детекции РНК-мишеней, является актуальной. Перед автором стояла задача осуществить дизайн и синтез пирен-содержащих олигонуклеотидов, в которых два остатка пирена были сближены в определенных условиях и образовывали эксимеры, которые легко детектируются по образованию характерной длинноволновой флуоресценции, изучить их физико-химические свойства и продемонстрировать возможность их использования для детекции протяженных РНК.

Диссертационная работа О.А. Крашенининой построена традиционно и состоит из введения, обзора литературы, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы. Содержание диссертации полностью соответствует специальности.

Во введении очень четко обоснована актуальность исследования, его научная новизна, практическая значимость работы, сформулированы ее цели и задачи, представлены основные положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы представлены спектральные и флуоресцентные свойства пирена в составе олигонуклеотидов, а также методы введения одного или нескольких

пиренильных остатков в различные положения нуклеозида (гетероциклическое основание, углеводный фрагмент) и в виде ненуклеозидных вставок. Структуры многочисленных описанных в литературе олигонуклеотидных конъюгатов с молекулой пирена и их локализация в структуре НК-дуплекса, образованного с участием пирен-содержащих олигомеров, суммированы в семи таблицах. Такой способ представления литературных данных с одной стороны облегчает поиск информации, с другой – демонстрирует разнообразие модифицированных пиреном нуклеиновых кислот. В обзоре также приведена подробная информация об областях применения пиренильных флуоресцентных зондов. Из данных литературы автор делает правильный вывод о перспективности разработки новых, отличающихся по структуре от существующих олигонуклеотидных зондов с остатками пирена. При этом диссертант учитывает, что видно из текста обзора, всю сложность поставленной задачи. Флуоресцентные свойства пирена в составе одно- или двутяжевой молекулы нуклеиновой кислоты не всегда предсказуемы и зависят от нуклеотидного окружения, положения в молекуле нуклеозида, длины и природы соединительного линкера, структуры дуплекса, что усложняет задачу создания универсального зонда и приводит автора к идее структурного разнообразия. Таким образом, представленный в обзоре материал служит необходимым введением в проблему, которая была поставлена и успешно решена в диссертационной работе О.А. Крашенининой.

Диссертационная работа О.А. Крашенининой представляет собой логически построенное исследование, предполагающее решение следующих задач:

Дизайн и синтез трех различных по структуре олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотидных) зондов, содержащих моно- и биспиренильные остатки.

Изучение физико-химических свойств образованных с участием модифицированных олигонуклеотидов и ДНК- или РНК-матрицей дуплексов.

Демонстрация возможности визуализации 28S рРНК в клетках с использованием тандемных зондов и зондов типа «молекулярный маяк».

На первом этапе были получены олиго(2'-*O*-метилрибонуклеотиды), в которых два остатка пирена присоединены к 2'-фосфатной группе, с различным количеством и локализацией по цепи модифицированного звена. Установленные автором факты: 1) образование прочных дуплексов с комплементарным олигорибонуклеотидом и 2) появление или повышение эксимерной флуоресценции по сравнению с одноцепочечным олигомером, позволяют сделать вывод о возможности детекции протяженной РНК с использованием созданных линейных 2'-биспиренильных зондов. Кроме того,

установленное автором влияние нуклеотидного окружения на величину эксимерной флуоресценции будет способствовать созданию зонда оптимальной последовательности.

Наиболее впечатляющими и интересными частями работы являются исследования tandemных зондов и зондов типа «молекулярный маяк». При синтезе tandemных зондов на 3'-конец одного из них и 5'-конец другого остаток пирена вводился с помощью большого набора линкеров, различающихся по структуре, а, следовательно, по длине и конформационной подвижности. Все возможные комбинации tandem-образующих олигонуклеотидов были протестированы на эффективность формирования эксимера при связывании с РНК-матрицей и найдена оптимальная структура линкера для каждого из них. Построенные молекулярно-динамические модели дуплексов tandemных зондов с РНК матрицей подтвердили экспериментальные результаты. На основании совпадения анализа МД-траекторий и наблюдаемого экспериментально появления интенсивной эксимерной флуоресценции можно сделать вывод о возможности предсказания оптимальной структуры концевой модификации зонда без огромного объема синтетической работы.

«Молекулярный маяк» - широко описанный и применяющийся метод определения ДНК и РНК. При этом в зависимости от количества и свойств флуорофоров, находящихся на концах «маяка», при гибридизации и разворачивании его структуры может происходить увеличение интенсивности флуоресценции или ее уменьшение, а также исчезновение эксимерной флуоресценции. О.А. Крашенинина выбрала оригинальную структуру, в которой на одном конце стебля «маяка» находились два остатка пирена, а на другом – тушитель флуоресценции. Об эффективности такой пары свидетельствовало отсутствие в спектрах испускания флуоресценции пика эксимерной флуоресценции, интенсивность пиков мономерной флуоресценции была пренебрежительно мала. При комплексообразовании с РНК-мишенью происходило восстановление как мономерной, так и эксимерной флуоресценции.

Следует отметить два достижения автора, свидетельствующих среди прочих о новизне, практической значимости и уникальности представленных результатов. Во всех экспериментах, касающихся трех предложенных в работе типов зондов, показавших перспективность их использования для определения нуклеиновых кислот в растворе и в клетке, были подобраны контроли, не оставляющие сомнения в достоверности полученных результатов. Сравнение спектров испускания флуоресценции для «молекулярного маяка», «маяка» без тушителя флуоресценции и линейного олигонуклеотида, модифицированного пиреном, но не образующего шпильки, подтверждает перспективность использования предложенной диссертантом

структуры зонда. При демонстрации возможности использования предложенных в работе зондов для визуализации внутриклеточной 28S рРНК были использованы клетки линии НЕК293 Phoenix. Флуоресцентный отклик фиксировали с помощью лазерного конфокального микроскопа. В контрольном эксперименте для подтверждения специфического связывания, с одной стороны, и отсутствия деградации зонда (что очень важно), с другой, фиксированные клетки обрабатывали РНКазой А. Эти два достоверно установленных факта являются определяющими для последующего применения предложенных в работе структур в качестве зондов.

О.А. Крашенинина продемонстрировала в процессе выполнения работы и ее написания прекрасное знание биоорганической и органической химии, что позволило ей успешно использовать большой набор химических превращений при синтезе модифицированных олигонуклеотидов. Все полученные соединения охарактеризованы современными методами, и их строение корректно подтверждено.

По теме диссертации опубликовано 4 экспериментальные статьи и 1 обзор в рецензируемых международных научных журналах. Публикации по итогам работы и автореферат в полной мере отражают основное содержание диссертации. Все выводы диссертации хорошо обоснованы и их достоверность не вызывает сомнений.

Подводя итог, необходимо отметить высокое качество не только экспериментальной работы диссертанта, но и подготовки диссертации. Вся работа написана хорошим литературным языком, очень хорошо структурирована, снабжена четкими и аккуратными рисунками и понятными таблицами.

Имеются замечания, не влияющие на общую положительную оценку работы и носящие скорее рекомендательный характер.

1. При взаимодействии алкинов с азидами реакцию лучше называть, как [3+2] циклоприсоединение.
2. При введении в олигонуклеотид биспиренильных остатков повышение стабильности дуплекса с ДНК и понижение с РНК матрицами объясняется с привлечением статьи, в которой изучали ДНК/ДНК и РНК/РНК дуплексы (стр. 83, Таблица 2.5). В диссертационной работе зонды представляют собой олиго(2'-O-метилрибонуклеотиды), которые и с ДНК и с РНК матрицами образуют А форму дуплекса. Поэтому в данном случае эта разница не очень понятна. Хотелось бы прочесть объяснение разницы в температуре плавления исходных немодифицированных дуплексов, которая сохраняется и для модифицированных. Также не совсем правильно объяснение, что дестабилизация дуплекса связана «с потерей некоторых водородных связей в дуплексе вследствие стерических затруднений, вызванных введением в 2'-положение громоздких

гидрофобных пиренильных групп, которые стремятся разместиться вне плотного дуплекса А-типа». Как связаны водородные связи и 2'-заместитель?

3. В главе 2.1 описаны линейные биспиренильные зонды, которые содержали концевой «инвертированный» тимидин для повышения их устойчивости к действию экзонуклеаз. Зачем это было сделано, не до конца понятно, так как данный зонд не испытывали на клетках, а факт повышения устойчивости к нуклеазному гидролизу при введении такой модификации известен давно.

4. Имеется небольшое количество орфографических ошибок. Например, в названии соединений после скобок не ставится дефис.

В целом диссертационная работа О.А. Крашенининой производит впечатление целостного логического исследования, при выполнении которого автор проявил высокое экспериментальное мастерство.

Диссертация написана четким научным языком. Ее содержание полностью отражено в публикациях и автореферате.

Полученные автором результаты могут быть использованы во всех лабораториях, где осуществляется дизайн и химический синтез модифицированных олигонуклеотидных зондов и изучение их взаимодействия с мишенями: в Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки - Институте биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институте молекулярной биологии РАН, на химическом факультете и НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и в ряде других научно-исследовательских институтов биохимического и медицинского профиля.

В заключение необходимо отметить, что диссертация Крашенининой О.А. является научно-квалификационной работой, направленной на решение важнейшей задачи создания новых флуоресцентных зондов для эффективной и специфической детекции РНК-мишеней. Работа представляет собой целостное и завершенное научное исследование, выполненное на высоком экспериментальном уровне. Результаты работы изложены чётко и ясно. Сделанные выводы обоснованы и подтверждаются полученными экспериментальными данными. По актуальности поставленных задач, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов диссертационная работа, представленная соискателем Крашенининой Ольгой Алексеевной, полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от

21.04.2016 № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Крашенинина Ольга Алексеевна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Официальный оппонент,
доктор химических наук,
профессор химического факультета
Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения
высшего образования "Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова"

/Татьяна Семёновна Орецкая/



специальность 02.00.10 – биоорганическая химия
почтовый адрес: 119991 Москва, Ленинские горы, д.1
телефон: +7 495 939 5411
адрес электронной почты: oretskaya@belozersky.msu.ru

Данные Орецкой Т.С. подтверждаю
Декан химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова
академик РАН, профессор



/Валерий Васильевич Лунин/



2 июня 2017 года