

В диссертационный совет Д003.045.01  
на базе Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Институт химической биологии  
и фундаментальной медицины СО РАН

### **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

на диссертационную работу Крашенининой Ольги Алексеевны "Новые пиренильные эксимер-образующие зонды на основе олиго(2'-О-метилрибонуклеотидов) для флуоресцентной детекции РНК", предоставленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биорганическая химия

Диссертационная работа О.А. Крашенининой относится к области химии нуклеиновых кислот и посвящена синтезу модифицированных олигонуклеотидов, содержащих в своем составе остатки пирена, а также изучению их флуоресцентных и гибридизационных свойств. В качестве объекта исследования выбраны олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды), напоминающие по своим гибридизационным свойствам РНК, но при этом существенно более стабильные в отношении нуклеаз. Введение остатков пирена в их состав производилось пост-синтетически, при этом главную роль играла оригинальная реакция активации фосфатной группы, позволяющая относительно просто вводить как один остаток пирена, так и сразу два, приводя к образованию эксимеробразующего бис-пиренильного фосфодиамидатного фрагмента.

Флуоресцентное мечение нуклеиновых кислот является основой большого числа молекулярно-биологических методов, среди которых - ПЦР режима реального времени и флуоресцентная *in situ* гибридизация. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) являются весьма интересными флуорофорами для модификации нуклеиновых кислот и конструирования сенсоров на их основе; при этом среди ПАУ пирен занимает особое место благодаря его способности образовывать эксимеры и реагировать на изменения в микроокружении. В этой связи не удивительно, что для изучения был выбран именно этот флуорофор. К настоящему моменту опубликовано значительное число работ, посвященных введению остатков пирена в состав нуклеиновых кислот для создания сенсоров на их основе. Этим публикациям и посвящен литературный обзор диссертации. Литературный обзор содержит более 200 ссылок на оригинальные работы, исчерпывающе

описывает существующие примеры синтеза конъюгатов нуклеиновых кислот с пиреном и включает в себя, в том числе, наиболее недавние публикации 2017 года. Классификация логичным образом построена на способе введения остатка пирена в олигонуклеотид.

Актуальность работы обусловлена потребностью в разработке новых сенсоров на основе нуклеиновых кислот для сиквенс-специфической детекции РНК, а также обнаружения одонуклеотидных замен. Следует отметить, что в отличие от описанных в литературе конъюгатов, объектом настоящей работы являются модифицированные остатком (остатками) пирена олиго(2'-О-метилрибонуклеотиды). Это в существенной степени обуславливает новизну работы - благодаря выбору именно этого сахарофосфатного остова автору диссертационной работы удалось дискриминировать гибридизацию зондов с РНК и ДНК, и как следствие, создать зонды для внутриклеточной детекции РНК-транскриптов, решив таким образом задачу, имеющую большое значение в области химии нуклеиновых кислот.

Работа выполнена на хорошем экспериментальном уровне и включает в себя, помимо синтеза нуклеиновых кислот и изучения их свойств, элементы органического синтеза (синтез фосфорамидита "инвертированного тимидина"), а также проведенное в сотрудничестве с коллегами компьютерное моделирование составных ДНК-дуплексов и эксперименты по визуализации РНК в клетках. Диссертация логично организована, хорошо оформлена, практически не содержит ошибок и опечаток. Тем не менее, в ходе ее изучения возникают некоторые вопросы и замечания:

1. Для ряда олигонуклеотидных конъюгатов, содержащих несколько остатков пирена, ввиду их высокой гидрофобности не удалось получить ни спектров MALDI-TOF, ни профилей ВЭЖХ. Поскольку электрофореграммы таких конъюгатов, как отмечает автор, характеризуются широкими размазанными полосами ("шмерами"), можно говорить о том, что характеристика этих конъюгатов отсутствует, за исключением спектров поглощения в УФ-видимой области. Возможно, проблема с получением спектров MALDI-TOF связана с использованием наконечников ZIP-TIP для обессоливания (об их применении свидетельствует экспериментальная часть). Эти наконечники содержат фазу C18 и вероятно необратимо связывают гидрофобные пиренильные конъюгаты. Вероятно следовало отказаться от использования обессоливающих наконечников для столь гидрофобных биомолекул, либо попробовать охарактеризовать их с помощью масс-спектрометрии с электроспрей-ионизацией. Есть также предположение, что профили ВЭЖХ этих конъюгатов можно получить, используя менее гидрофобную фазу, чем C18, например C8 или C4. Аналогичным образом, спектрами MALDI-TOF не был охарактеризован ни один из олигонуклеотидов, содержащих тушитель BHQ1.

2. В ЯМР-спектрах ди- и моно-тритилированного тимидина (соединения 2.1 и 2.2, стр. 139-140) протонные сигналы углеводной части молекулы описаны одним мультиплетом, хотя они как правило очень хорошо разрешаются, находясь в различном химическом окружении. Не вполне понятно, почему сигнал 2'-протона также попадает в область 3.15-4.40 м.д. - типичным химическим сдвигом для него является 2.0-2.5 м.д. (см. например *Molecules*, 2013, 18, рис. S1), так как 2'-CH<sub>2</sub> является изолированной метиленовой группой, не связанной напрямую с гетероатомами. Следует отметить, что ЯМР-спектры диметокситритилированных нуклеозидов чаще записывают в ДМСО-d<sub>6</sub>, так как, во-первых, хлороформ обычно содержит кислотные примеси, которые могут снимать тритильную защиту, а во-вторых, в ДМСО, в отличие от хлороформа, можно наблюдать сигналы гидроксильных групп. Не ясно, каким образом было доказано, что при обработке бромидом цинка действительно была снята именно 5'-концевая защитная группа, и таким образом был получен "инвертированный" тимидин, а не "обычный" тимидин. В случае, если в действительности была снята 3'-концевая диметокситритильная группа, одномерный ЯМР-спектр полученного 5'-диметокситритилированного тимидина в хлороформе будет неразличимым с желаемым 3'-диметокситритилированным тимидином (во всяком случае, для доказательства необходимо сравнение с заведомо известным образцом). Для того, чтобы различить эти изомерные тритилированные тимидины, необходимо записать спектр в ДМСО-d<sub>6</sub>, в котором можно наблюдать сигналы гидроксильных групп (5' и 3'-гидроксилы будут иметь различную мультиплетность), либо доказать структуру двумерным ЯМР.
3. На стр. 107 автор называет триэтиленгликолевый линкер "длинным жестким линкером", и делает вывод о том, что поведение модификации с этим линкером отличается от поведения модификации с углеводородным линкером по причине жесткости триэтиленгликоля. Однако, на основании большого количества экспериментальных данных в различных областях (например, в химии высокомолекулярных соединений) общепринято мнение, что линкеры на основе олигоэтиленгликолей напротив характеризуются высокой гибкостью (например, *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28(9), 1859-1863; *Macromolecules*, 2013, 46(3), 656-663; Neri, P., Sessler, J.L., Wang, M.-X. *Calixarenes and Beyond*, Springer, 2016, ISBN 978-3-319-31867-7). Вероятно, вытеснение пирена из дуплекса связано не с жесткостью триэтиленгликоля, а с его высокой гидрофильностью (способствующей сольватации модификации и вытеснению ее в раствор), либо энтропийным фактором (более длинные линкеры, имеющие больше степеней свободы, менее склонны к образованию структур с фиксированной конформацией, чем короткие).

4. Ссылка 212 (стр. 66, в контексте отсылки к "большому числу известных зондов для детекции НК") относится к обзорной статье, внесенной в список публикаций, в которых опубликованы результаты диссертации.

Приведенные замечания носят частный характер, не умаляют достоинств диссертации и не отражаются на ее общей положительной оценке. Представленная научно-квалификационная работа является актуальным научным исследованием, выполненным на высоком теоретическом и экспериментальном уровне. Основные положения и выводы работы оригинальны, основаны на большом экспериментальном материале, их достоверность не вызывает сомнения. Основные результаты диссертации опубликованы в пяти статьях в четырех реферируемых научных журналах, входящих в перечень изданий, утвержденный Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций. Представленные выводы обоснованы, соответствуют поставленным в диссертационной работе целям и в полной мере отражают объем полученного экспериментального материала. Представленная диссертационная работа соответствует требованиям "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), так как в ней содержится решение задачи, имеющей существенное значение для создания эффективных молекулярно-биологических инструментов исследования нуклеиновых кислот, а ее автор - Крашенинина Ольга Алексеевна - заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биорганическая химия.

Официальный оппонент -

кандидат химических наук, научный сотрудник  
Лаборатории органического синтеза ИБХ РАН

Устинов Алексей Викторович

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук  
117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10

Телефон: +7 (495) 335-01-00

Факс: +7 (495) 335-08-12

Эл. почта: [austinov@yandex.ru](mailto:austinov@yandex.ru)

ПОДПИСЬ ЗАВЕДУЮЩЕГО  
УЧЕБНО-НАУЧНОГО  
ИБХ РАН  
А.Ф.М. В.А.Овчинников