

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

Щур Вероники Владимировны

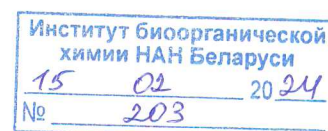
«Разработка новых подходов к получению синтетической ДНК»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по
специальности 02.00.10 – Биоорганическая химия

Соответствие диссертации специальности и отрасли науки

Диссертационная работа Щур В.В. представляет собой исследование, посвященное разработке новых эффективных подходов к получению синтетической двунитевой ДНК (днДНК) и созданию на их основе автоматизируемой, экономичной лабораторной технологии химико-ферментативного синтеза ДНК. На основе анализа содержания диссертации, автореферата, публикаций соискателя, диапазона решаемых проблем и оценки методических подходов считаю, что работа Щур В.В. соответствует отрасли «химические науки», заявленной специальности 02.00.10 – биоорганическая химия (пп. 4, 8, 9 раздела III Паспорта специальности) и требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пп. 20–26 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий).

Актуальность темы диссертации

Диссертационное исследование относится к биоорганической химии и является важным направлением в изучении отношений «структура – функция» в ряду биополимеров – нуклеиновых кислот и белков. Методологически изучение этих соединений являлось взаимно дополняющим и касалось изучения первичных структур, встречного синтеза, структурной организации более высокого порядка. Многие достижения в этой области являются уже привычными, хотя получение генно-инженерных фармакологически-активных соединений (например, биотехнологии инсулина человека, соматотропного гормона и др.) принципиально изменили возможности медицины и сельского хозяйства.



Химиико-ферментативный синтез ДНК *de novo* – одно из актуальных направлений синтетической биологии, целью которого является конструирование новых продуцентов физиологически-активных веществ, получение вакцин и средств для генной терапии, создание систем для редактирования генома и многое другое. Синтез днДНК включает в себя семь «классических» этапов: разбиение последовательности ДНК на олигонуклеотиды, их обратный химический фосфорамидитный синтез, ферментативное объединение в днДНК, увеличение ее количества путем амплификации, введение в плазмидный вектор, поиск целевых последовательностей и исправление ошибок синтеза.

Диссертантом выявлены ряд проблем и ограничений, а также предложены подходы по их преодолению для пяти из семи стадий процесса. Так, например, отказ от индивидуальной очистки олигонуклеотидов затратными по времени и стоимости методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) или электрофореза (ЭФ) в пользу групповой очистки методом твердофазной экстракции с применением миниатюрной хроматографической системы позволил существенно модифицировать стадию подготовки олигонуклеотидных блоков.

Тематика диссертации соответствует приоритетным направлениям научной, научно-технической и инновационной деятельности на 2021–2025 годы (Указ Президента Республики Беларусь от 7 мая 2020 г. № 156) по п. 2 «Биологические, медицинские, фармацевтические и химические технологии и производства: системная и синтетическая биология», что подчеркивает ее актуальность.

Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и научных положений, выносимых на защиту

1. Автором впервые показано, что для очистки и дозирования сложной смеси протяженных олигонуклеотидов непосредственно перед сборкой синтона можно использовать метод твердофазной экстракции с использованием наконечников, заполненных подобранным сорбентом с

известной емкостью, величиной пространственной группы, размером частиц и пор носителя.

2. Экспериментально установлено, что сочетание двух различных методов сборки днДНК, приводит к оптимизации длины, выхода и частоты ошибок в нуклеотидных последовательностях, что позволило увеличить длину синтона в 1,5 раза и получить обогащенный целевой последовательностью продукт, пригодный для лигирования в плазмидный вектор без предварительной очистки.

3. Продемонстрирована возможность с помощью динамического светорассеяния контролировать полимеразную цепную сборку синтона.

4. Установлена природа высокомолекулярных побочных продуктов ферментативного синтеза днДНК и обоснован механизм их образования, представляющий собой конкатемерную цепную реакцию.

5. Впервые изучена температурная стабильность олигонуклеотидов с 5'-диметокситритильной защитной группой и показана возможность их использования для полимеразной цепной сборки.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность полученных результатов и обоснованность выводов в диссертационной работе обеспечены применением разнообразных современных методов биоорганической химии: фосфорамидитный синтез олигонуклеотидов, твердофазная экстракция, ВЭЖХ, ЭФ, масс-спектрометрия, спектрофотометрия, методы светорассеяния, полимеразная цепная реакция, установление последовательностей нуклеотидов по Сэнгеру. Обработка экспериментальных данных, проведение основных этапов химико-ферментативного синтеза осуществлялось с использованием современных программных систем.

Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию

Научная значимость результатов диссертации подтверждена публикациями в рецензируемых зарубежных и отечественных журналах и заключается в разработке: способа получения смеси очищенных протяженных олигонуклеотидов непосредственно перед объединением в ДНК-синтон; в создании нового дизайна и способа сборки днДНК, что позволило увеличить предельную длину синтона в 1,5 раза и получить обогащенный целевой последовательностью продукт; в демонстрации возможности применения методов светорассеяния для наблюдения в режиме реального времени за сборкой синтона из олигонуклеотидов; в установлении конкатемерной природы высокомолекулярных побочных продуктов ферментативного синтеза днДНК и механизма их образования; в установлении факторов, определяющих стабильность 5'-диметокситритильной защитной группы олигонуклеотидов в условиях ПЦР, а также влияния данной защитной группы в составе днДНК на активность ДНК-лигазы и ДНК-полимеразы. Все вышеперечисленное позволило создать оригинальную лабораторную технологию химико-ферментативного *de novo* синтеза ДНК.

Рецензент подчеркивает, что научная новизна определяет и практическое значение данной диссертации, поскольку дальнейшее развитие исследований в этом направлении должно привести к созданию опытно-промышленных регламентов для получения целевых продуктов. Кроме того, практическую значимость работы также подтверждает патент на изобретение и два лабораторных технологических регламента. В соответствии с регламентами выполняется синтез искусственных генов на заказ для организаций Республики Беларусь, а также обеспечиваются собственные научно-исследовательские разработки Института биоорганической химии по выполнению заданий Государственных программ научных исследований.

Наличие собственной технологии синтеза искусственных генов необходимо для развития современной биотехнологической промышленности, научных исследований и решения актуальных проблем медицины. К сожалению, приходится констатировать, что у нас имеется значительное отставание от мировых лидеров.

Опубликованность результатов диссертации в научной печати

Результаты диссертационной работы Щур В.В. опубликованы в 11 печатных работах: в 4 статьях в рецензируемых зарубежных и отечественных научных журналах, тезисы 6 докладов и 1 патент на изобретение. Общий объем опубликованных статей составляет 3,97 авторских листа. Результаты и основные положения диссертации были в достаточной мере представлены и обсуждены в научной литературе.

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Работа состоит из перечня сокращений и обозначений, введения, общей характеристики, трех глав (обзор литературы, методы исследований, результаты и обсуждение), заключения, списка использованных источников и приложения. Диссертация изложена на 186 стр., проиллюстрирована 38 рисунками, содержит 21 таблицу, библиографический список (179 наименований цитируемой литературы и 11 публикаций соискателя) на 16 стр. и 4 приложения на 13 стр.

В обзоре литературы цитируется 167 источников и приведены сведения о достижениях и перспективах развития синтетической биологии. Описаны и проанализированы семь ключевых этапов химико-ферментативного синтеза двунитевой ДНК. Рецензент отмечает, что автор аргументированно обосновал выбор направления исследования, а также показал целесообразность и место собственных разработок среди существующих подходов.

В главе Методы исследования охарактеризованы реагенты, материалы, оборудование и программное обеспечение, использованные в работе. Приводятся данные о модельных ДНК для экспериментов. Автором освоено и применено широкое разнообразие методов, относящихся к органической и аналитической химии, молекулярной биологии и генетической инженерии, а также к компьютерному моделированию макромолекул.

В третьей главе приведены и корректно обсуждены результаты экспериментов по получению полупродуктов и конечного продукта синтеза днДНК. Для каждого раздела главы приведены краткое введение и выводы со

ссылками на основные публикации автора. Приведены литературные данные для обсуждения полученных результатов.

Считаю важным, что в заключении автор приводит рекомендации и перспективы дальнейшего развития данной тематики исследований: повышение производительности и масштабирование технологии, получение других продуктов на ее основе, в частности, библиотек синтетических генов.

В приложениях к диссертации показаны вспомогательные данные, касающиеся проведения экспериментов, а также документы, подтверждающие практическую значимость работы (лабораторные технологические регламенты и патент на изобретение).

Автореферат исчерпывающе раскрывает содержание диссертационного исследования и не содержит излишних деталей, а также данных, отсутствующих в диссертации.

Замечания

При рассмотрении диссертации и автореферата не выявлено принципиальных недостатков, которые могли бы вызвать сомнение в достоверности научных выводов и положений, вынесенных на защиту.

Замечания:

В экспериментальной части автореферата целесообразно отметить фирмы изготовители оборудования, программных продуктов, основных реагентов.

На рисунках в автореферате, иллюстрирующих ЭФ желательно привести степень чистоты целевых соединений, получаемых после выделения и очистки.

В обзоре литературы отсутствуют работы, опубликованные в научных изданиях бывшего СССР и не отмечен вклад ученых СССР в этой области.

Рисунок 4 Автореферата, посвященный светорассеиванию излишне насыщен, в частности, не пояснена необходимость анаморфозы первой производной.

Имеется ряд неудачных формулировок: “...практически бесконечным...”, “...потенциально автоматизируемой...”, “...весьма протяженные синтоны...”.

Рецензенту безусловно хотелось бы увидеть реализацию данной работы на одном из примеров использования искусственных генов, но объективно это не входило в задачи настоящей работы.

Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует

Диссертационная работа Щур В.В. является успешным законченным научным исследованием, в рамках которого рассмотрен ряд сложных проблем. При ее выполнении соискатель продемонстрировала умение выбирать рациональные подходы к решению поставленных задач, способность корректно интерпретировать, анализировать и научно обосновывать собственные экспериментальные результаты с применением большого разнообразия современных методов биоорганической химии и сведений из литературных источников. Полученные соискателем результаты имеют высокую научную и практическую значимость и четкие перспективы дальнейшего практического использования. Считаю, что Щур Вероника Владимировна является квалифицированным специалистом и заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Формулировка конкретных научных результатов (с указанием их новизны и практической значимости), за которые присуждена ученая степень

Ученая степень кандидата наук может быть присуждена в соответствии с п. 20 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь» за новые научно обоснованные теоретические и экспериментальные результаты.

□ Создание способа получения пулов очищенных олигонуклеотидных блоков для ферментативного синтеза двунитевой ДНК на основе твердофазной экстракции с использованием миниатюрной

хроматографической системы, что позволяет проводить одновременное дозирование и очистку олигонуклеотидов для сборки ДНК-синтона.

□ Разработку способа ферментативной сборки днДНК, позволяющего увеличить предельную длину синтона в 1,5 раза и в одну стадию получать обогащенный целевой последовательностью продукт, пригодный для лигирования в плазмидный вектор без предварительной очистки.

□ Применение методов светорассеяния для контроля в режиме реального времени процесса ферментативного объединения олигонуклеотидных блоков в днДНК.

□ Предложенный механизм образования высокомолекулярных побочных продуктов в процессе сборки ДНК-синтонов, представляющий собой конкатемерную цепную реакцию.

□ Установление влияния 5'-диметокситритильной защитной группы олигонуклеотидов на активность ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы, что позволило предложить способ селективного лигирования верных по длине синтонов в плазмидный вектор.

Научные результаты, перечисленные выше, позволили создать потенциально автоматизируемую, эффективную лабораторную технологию химико-ферментативного синтеза днДНК произвольной последовательности, что вносит весомый вклад в биоорганическую химию нуклеиновых кислот и ферментов.

Официальный оппонент:

член-корреспондент НАН Беларуси,
доктор биологических наук, профессор,
профессор кафедры высокомолекулярных
соединений химического факультета БГУ

В.М. Шкуматов

