

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

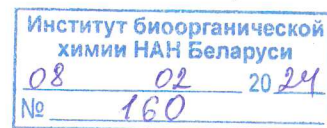
Соответствие диссертации специальности и отрасли науки

Диссертационная работа Щур В.В. представляет собой целостное исследование, посвященное разработке новых эффективных подходов к получению синтетической дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и созданию автоматизируемой, низкзатратной по времени и ресурсам технологии, которая позволит синтезировать верную по нуклеотидной последовательности двухцепочечную ДНК. На основании содержания диссертации, автореферата, опубликованных работ, по предмету и методам исследования считаю, что работа Щур В.В. соответствует заявленной специальности 02.00.10 – биоорганическая химия, отрасли «химические науки» и требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Диссертация соответствует паспорту специальности в п. 4 «Высокомолекулярные соединения: природные и рекомбинантные белки, нуклеиновые кислоты и их компоненты, полисахариды и другие биополимеры. Выделение, синтез, модификация и структурно-функциональные исследования» и п. 8 «Создание высокоэффективных биотехнологических процессов».

Актуальность темы диссертации

Диссертационное исследование проведено в актуальной области современных наук о жизни, относится к биоорганической химии, выполнено в интересах молекулярной генетики и биотехнологии и посвящено разработке эффективных способов и методов *de novo* химико-ферментативного синтеза двухцепочечных ДНК.

Актуальность диссертационной работы Щур В.В. не вызывает сомнений. Технология синтеза генов открывает новые возможности для решения задач биоорганической химии и биотехнологии. Искусственный



синтез гена позволяет как получить точные копии естественных генов, так и редактировать геном. Спектр применения синтетических генов широк. Встроив ген в клетки бактерий, дрожжей или других продуцентов, можно заставить их синтезировать нужные белки и ферменты. Ген с соответствующим регуляторным элементом может выступать в качестве ДНК-вакцины, которая прямо в организме запустит процесс синтеза целевого антигена и обеспечит гуморальный и клеточный иммунитет. Гены, объединенные в генные сети, позволяют создавать продуцентов веществ, недоступных для методов современной органической химии (так, например, получают гормон роста, интерфероны, терапевтические антитела). Гены в сочетании со специализированными средствами доставки и современными методами редактирования геномов – это способ терапии наследственных заболеваний.

Получение искусственных генов – сложная и многостадийная работа, которая начинается с компьютерного анализа последовательности и требует осуществления ряда этапов, включая дизайн, синтез, обработку и очистку олигонуклеотидных блоков, ферментативный синтез двухцепочечной ДНК, ее амплификацию, объединение фрагментов, встраивание в генетический вектор (плазмиду), клонирование в бактериях, скрининг последовательностей необходимой длины, очистку плазмид, секвенирование и исправление ошибок.

В теории и эксперименте такой работы в настоящее время существует целый ряд проблем и нерешенных вопросов. Так описанные в литературе синтезы позволяют получать двухцепочечные ДНК с предельным размером до 1 000 п.н. Более протяженные синтоны или не образуются, или содержат слишком много ошибок.

Эффективность получения ДНК заданной структуры зависит от правильного и рационального осуществления всех стадий, поэтому для достижения цели диссертационной работы и выполнения поставленных задач соискателю пришлось теоретически и экспериментально исследовать каждый из этих сложных этапов, и для пяти из них Щур В.В. предложила и апробировала новые способы реализации.

Об актуальности темы диссертации свидетельствует и тот важный факт, что она 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».

Кроме того, диссертационная работа является частью плановых исследований структуры и функций биополимеров, проводимых в Институте биоорганической химии НАН Беларуси. Она выполнена в рамках Отдельного проекта фундаментальных и прикладных научных исследований «Разработка и автоматизация эффективных методов получения синтетических генов» (постановления Бюро Президиума НАН Беларуси № 22 от 15 января 2018 г. и № 116 от 12 марта 2019 г.), а также по заданию 2.3.4. «Структурный анализ, направленная эволюция и получение рекомбинантных цитохром P450-зависимых монооксигеназ и ферментов биосинтеза ДНК для скрининга и метаболической инженерии» ГПНИ «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия» на 2021–2025 годы и в соответствии с грантом, учрежденным Президиумом НАН Беларуси для поддержки молодых ученых, по теме «Разработка новых подходов к получению синтетической ДНК».

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

Научные результаты, полученные в диссертации Щур В.В. и вошедшие в положения, выносимые на защиту, обладают существенной степенью новизны.

– Показано, что в миниатюрной хроматографической системе, представленной в виде наконечника, для твердофазной экстракции с обращенно-фазовым сорбентом можно одновременно проводить дозирование и очистку синтезированных олигонуклеотидов. Эта система и методика ее применения положены в основу разработанного и представленного нового

способа получения очищенных олигонуклеотидных блоков для последующей ферментативной сборки ДНК.

– Установлено, что комбинированная ферментная сборка по специальной температурной программе позволяет получить из подготовленных нуклеотидов за один этап обогащенные целевой последовательностью ДНК-синтоны с длиной более 1500 пар оснований. На этой основе разработан метод программируемой ферментативной сборки целевой двухцепочечной ДНК, протяженность которой в 1,5 раза превышает известный из литературных источников лимит длины ДНК-синтона, а достигаемая чистота достаточна для лигирования полученного продукта в плазмидный вектор.

– Впервые продемонстрирована возможность применения метода динамического светорассеяния для наблюдения в режиме реального времени за ферментативной сборкой двухцепочечной ДНК из олигонуклеотидных блоков.

– Выявлен механизм формирования высокомолекулярных побочных продуктов из-за ошибок в процессе сборки двухцепочечной ДНК, которые идентифицированы как регулярно повторяющиеся последовательности, многократно увеличивающиеся в длине в результате конкатемерной цепной реакции.

– Установлен факт стабильности 5'-диметокситритильной защитной группы олигонуклеотидов в условиях полимеразной цепной реакции и определено влияние 5'-диметокситритильной защиты на активность Т4 лигазы в реакции лигирования тупых концов двухцепочечной ДНК. Это позволило разработать селективный по отношению к укороченным побочным продуктам способ предотвращения их лигирования в плазмидный вектор.

Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Достоверность полученных результатов и обоснованность сформулированных выводов и рекомендаций в диссертации Щур В.В. не вызывает сомнений. Они базируются на анализе экспериментального

материала, полученного с использованием широкого спектра современных методов биоорганической химии, включающих синтез олигонуклеотидов, полимеразная цепная реакция, секвенирование, клонирование, трансформация, рестрикционный анализ, хроматография, электрофорез, спектрофотометрия, масс-спектрометрия, динамическое и статическое светорассеяние. Выводы и положения, выносимые на защиту, соответствуют содержанию диссертации, цели и задачам работы.

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

Результаты диссертационной работы Щур В.В. имеют высокую научную и практическую значимость.

Научная значимость полученных в работе результатов заключается в разработке оригинальной технологии химико-энзиматического *de novo* синтеза протяженных (до 1600 п.н.) ДНК-синтонов с минимизированной вероятностью возникновения ошибок. Эта разработка защищена патентом. «Способ получения смесей очищенных олигонуклеотидов для ферментативного *de novo* синтеза двуцепочечной ДНК»: патент на изобретение ВУ 23440 (дата регистрации 29.04.2021) / А.В. Янцевич, В.В. Щур, С.А. Усанов. – Оpubл. 30.06.2021.

Практическую значимость результатов диссертации трудно переоценить. Разработаны и утверждены два лабораторных технологических регламента, по которым выполняется синтез искусственных генов. В рамках хозяйственных договоров с организациями Республики Беларусь, работающими в области биотехнологии, получен 41 синтетический ген общей протяженностью 43644 п.н. Также обеспечивается научно-исследовательская работа по теме Государственной программы научных исследований «Химические процессы, реагенты и технологии, биорегуляторы и биооргхимия» на 2021–2025 годы и поддерживается выполнение ряда мероприятий Государственной программы «Наукоемкие технологии и техника» на 2021–2025 годы.

В перспективе результаты диссертации могут использоваться для наработки искусственных генов и библиотек генов ферментов и моноклональных антител, значимых для медицинской диагностики и терапии.

Опубликованность результатов диссертации в научной печати

Основные результаты диссертационной работы Щур В.В. в достаточной степени отражены в опубликованных автором 11 работах. В том числе 4 статьи в рецензируемых научных зарубежных и отечественных журналах, тезисы 6 докладов и 1 патент на изобретение.

Соответствие оформления диссертации требованиям ВАК

Диссертация Щур В.В. является законченной научно-исследовательской работой, которая выполнена автором самостоятельно, а по объему и содержанию соответствует требованиям п. 20, п. 24, п. 26 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь».

Диссертационная работа включает в себя общую характеристику, три главы, заключение, список использованных источников и приложения. Объем диссертации составляет 186 стр., из них основной текст на 141 стр. (включая 38 рисунков и 20 таблиц), библиографический список (179 наименований цитируемой литературы и 11 публикаций соискателя) на 16 стр., 4 приложения на 13 стр.

В представленном в диссертации обзоре литературы цитируется 167 источников, он дает достаточно четкое представление о существующих методах получения синтетической ДНК и ограничениях их применения.

Во второй главе (методы исследования) описаны реагенты, материалы, оборудование и программное обеспечение, используемое в диссертационной работе. Обращает на себя внимание многообразие методических подходов, которыми овладел автор диссертации. Для дизайна сборки ДНК использовалось программное обеспечение. Для получения олигонуклеотидных блоков использован твердофазный фосфорамидитный синтез, для очистки применялась твердофазная экстракция, ВЭЖХ,

электрофорез. При работе с синтетической ДНК использован ряд молекулярно-биологических методов: ПЦР, клонирование, трансформация, выделение плазмидной ДНК, рестрикционный анализ, агарозный электрофорез. Для подтверждения структуры получаемых макромолекул применяли ВЭЖХ, масс-спектрометрию, секвенирование по Сэнгеру, методы динамического и статического светорассеяния.

В третьей главе, посвященной результатам и обсуждению, представлены и проанализированы полученные диссертантом экспериментальные новые данные в области получения синтетической двухцепочечной ДНК. Результаты разбиты на поэтапные тематические подразделы, изложены и обсуждены логично, корректно и аргументировано, их анализ сопровождается необходимым иллюстративным материалом.

Основные научные результаты диссертации и рекомендации по их практическому использованию отражены в заключении.

Текст диссертации завершается приложениями, где приведены документы, подтверждающие научную и практическую значимость представленных в диссертационной работе исследований.

Диссертация Щур В.В. оформлена в соответствии с требованиями ВАК, материал изложен логично, без существенных погрешностей, затрудняющих чтение рукописи. Автореферат диссертации отражает суть работы и полностью соответствует содержанию 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. Тем не менее имеется ряд замечаний и вопросов.

Мелкие подписи на рисунках масс-спектров (стр. 105, 106, 142). Не все аббревиатуры, приведенные на рисунках и таблицах, расшифрованы (стр. 16, 23, 121), некоторые аббревиатуры сначала вводятся, потом расшифровываются (стр. 75). Присутствуют помарки, описки, отсутствуют знаки препинания (стр. 34, 61, 119, 121). В главе 1 «Обзор литературы» п. 1.4. полностью отсутствуют

ссылки на литературу (стр. 50–51). В разделе «Заключение» в конце стр. 155 отсутствует концовка предложения. В названии подпунктов подглав п. 1.4.2.1 и 1.4.2.2 перемешаны русские и английские слова (стр. 56–58).

В качестве уточнения хотелось задать вопросы.

– В работе указана последовательность гена холестериноксидазы как 1544 п.н. (глава 2, п. 2.5.2.1, стр. 91; рис. 3.11 стр. 120; п. 3.2.3 стр. 127) и 1573 п.н. (глава 2, п. 2.5.2.2, стр. 92; и глава 3, п. 3.2, стр. 119). Какая из них верная?

– Будут ли продлены лабораторно-технические регламенты №5/2019-ЛТР и №6/2019-ЛТР, срок действия которых заявлен в приложениях до 17.07.2023.

Приведенные замечания не влияют на сделанные автором выводы, на положения, выносимые на защиту, а также на общую высокую оценку диссертации.

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, умение 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 пп. 20-21 «Положения о присуждении ученых степеней и присвоения ученых званий в Республике Беларусь» за новые научно обоснованные теоретические и экспериментальные результаты, включающие:

- разработку способа получения очищенных олигонуклеотидных блоков для ферментативного синтеза двунитевой ДНК, заключающегося в использовании для твердофазной экстракции наконечников дозаторов с обращенно-фазовым сорбентом с диаметром пор 200 Å и позволяющего проводить одновременное дозирование и очистку олигонуклеотидов для сборки ДНК-синтона;

- разработку способа программируемой ферментативной сборки двухцепочечных ДНК, основанного на сочетании двух методов и который позволяет получать обогащенные целевой последовательностью и протяженные (до 1600 п.н.) ДНК-синтоны за один этап;

- установление применения метода светорассеяния для контроля процесса ферментативного синтеза днДНК из олигонуклеотидных блоков в режиме реального времени;

- установление механизма образования высокомолекулярных побочных продуктов в процессе сборки ДНК, заключающееся в образовании последовательности с идентичными фланкирующими участками в результате некорректного отжига концевых олигонуклеотидов с последующей конкатемерной цепной реакцией;

- установление факта стабильности 5'-диметокситритильной защитной группы олигонуклеотидов в условиях полимеразной цепной реакции и влияния 5'-диметокситритильной защиты на активность Т4 лигазы в реакции лигирования тупых концов двунитевой ДНК, которые легли в основу предложенного способа селективного лигирования целевых генов в плазмидный вектор;

что в совокупности позволило соискателю разработать технологию химико-энзиматического *de novo* синтеза протяженных (до 1600 п.н.) двунитевых ДНК с минимизированной вероятностью возникновения ошибок, а также вносит заметный вклад в биоорганическую химию получения синтетических двунитевых ДНК.

Официальный оппонент:

Ведущий научный сотрудник лаборатории

химии белковых гормонов Института

биоорганической химии НАН Беларуси,

кандидат химических наук, доцент

Т.С. Серченя

