

ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата химических наук
А.В. Шернюкова
на диссертационную работу Гольшева Виктора Михайловича
«РАЗВИТИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ РАЦИОНАЛЬНОГО ДИЗАЙНА
НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ»,
представленную на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук
по специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных
состояний вещества

Диссертационная работа Гольшева В.М. посвящена экспериментальному изучению физико-химических свойств новых производных нуклеиновых кислот, а также созданию методов для прогностической оценки их параметров. В качестве модельных объектов были выбраны положительно заряженные и незаряженные производные олигонуклеотидов: глицин-морфолиновые (gM) и фосфорилгуанидиновые олигонуклеотиды (ФГО) и их комплексы с ДНК и РНК. Производные gM и ФГО были разработаны ранее в ИХБФМ СО РАН и являются перспективными для дизайна модифицированных олигонуклеотидов. Необходимость модификаций вызвана тем обстоятельством, что нативные олигонуклеотиды не обладают нужными физико-химическими и молекулярно-биологическими свойствами для их практического применения. Например, такие производные могут использоваться в качестве комплементарно-специфических зондов в системах молекулярной диагностики или праймеров в полимеразно-цепной реакции. С целью рационального дизайна ФГО и gM для практических применений необходима информация об их физико-химических, в том числе гибридизационных свойствах. Актуальность работы также подтверждается 2мя грантами РФФИ, грантом РНФ и двумя грантами ПФНИ.

Целью диссертационной работы является детальное изучение физико-химических свойств глицин-морфолиновых и фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов и их комплементарных комплексов с ДНК и РНК, направленное на разработку подходов прогностического расчета их функциональных характеристик.

Диссертация разбита на 7 разделов: введение, три главы с результатами работы, заключение, результаты и выводы, список сокращений, список цитируемой литературы (177 наименований). Объем диссертации составляет 162 страниц машинописного текста, содержит 53 рисунка и 21 таблицу.

Во введении описана актуальность и разработанность темы, сформулированы цели и задачи исследования, описаны научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, методы исследования, формулируются положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов исследования, личный вклад автора и сведения об апробации результатов.

Первая глава является литературным обзором по четырем ключевым темам имеющим отношение к материалу исследования диссертации. В ней дано представление об нуклеиновых кислотах и их производных, методах молекулярно-динамического моделирования биомолекулярных систем, а так же о важных для диссертации экспериментальных методах определения и расчета концентрации олигонуклеотидов в растворах и исследования методом термической денатурации с оптической регистрацией сигнала. Кроме того, приводятся известные сведения об объектах исследования – глицин-морфолиновых аналогов нуклеиновых кислот и фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидах, несущих N, N'-замещенные остатки гуанидина.

Во второй главе описаны экспериментальные методы и методы компьютерного моделирования, использованные в работе.

Третья глава посвящена описанию и обсуждению полученных результатов и состоит из четырех частей. В первой части описан разработанный подход для определения физико-химических свойств коротких производных нуклеиновых кислот. Во второй части обсуждены исследования структуры и термодинамических свойств комплексов глицин-морфолиновых пентааденилатов с ДНК и РНК. Третья часть главы посвящена результатам исследования фосфорилгаунидиновых олигонуклеотидов и их комплексов с ДНК. В заключительной части обсуждается возможность расчета термодинамических параметров гибридизации ДНК/РНК и РНК/РНК с использованием молекулярно-динамического моделирования.

В заключение автором обсуждаются возможности применения предложенной схемы для оценки гибридизационных свойств и возможные применения новых аналогов нуклеиновых кислот, а также перспективы дальнейших исследований по затронутым темам.

Результаты и выводы сформулированы в виде пяти пунктов.

Научная новизна работы заключается в следующем. Создан подход для изучения физико-химических свойств коротких низкостабильных комплексов нуклеиновых кислот и их производных. С его помощью охарактеризованы комплексы пентааденилатов глицин-морфолина с ДНК и РНК. Впервые проведено детальное исследование физико-химических свойств нового класса незаряженных производных нуклеиновых кислот – фосфорилгуанидиновых олигонуклеотидов (ФГО) при помощи экспериментальных методов и методов компьютерного моделирования. Показана возможность достоверного определения концентрации ФГО при помощи метода УФ-спектроскопии. Определено влияние ФГ-модификаций на структуру дуплексов. Разработана предсказательная модель для расчета термодинамических параметров комплексообразования для ФГО/ДНК дуплексов при различных ионных силах раствора. С использованием представительного набора РНК/ДНК и РНК/РНК дуплексов впервые продемонстрирована принципиальная возможность достоверного расчета термодинамических параметров их формирования с использованием методов молекулярно-динамического моделирования и анализа МД-траекторий методом MMGBSA.

Практическая значимость заключается в следующем. Данные о физико-химических свойствах ФГО и модель для расчета термодинамических параметров формирования ФГО/ДНК дуплексов будут применяться при дизайне зондов для приложений, нацеленных на использование их комплементарно-специфических взаимодействий с ДНК. В частности, при использовании ФГО в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции (ПЦР), что позволяет увеличить специфичность данного подхода. Кроме того, данные незаряженные зонды являются перспективными для селективного связывания молекул-мишеней в системах молекулярной диагностики, построенных на основе полевых транзисторов. Модель определения термодинамических параметров комплексообразования для коротких низкостабильных олигонуклеотидов будет использована при исследовании новых аналогов и производных нуклеиновых кислот, для которых затруднен синтез протяженных олигомеров. Опробованный в работе подход расчета термодинамических параметров комплексообразования при помощи обработки МД траекторий методом MMGBSA может быть использован для оценки термостабильности комплексов новых аналогов и производных нуклеиновых кислот.

Достоверность представленных в работе результатов обусловлена использованием современных экспериментальных подходов, методов компьютерного моделирования и воспроизводимостью полученных результатов. Значимость обсуждений и выводов в работе была признана научным сообществом, что подтверждается публикациями в рецензируемых российских и международных журналах

По диссертационной работе имеется ряд замечаний.

1. В подходе, предложенном автором для экспериментального определения достоверных величин термодинамических параметров коротких производных нуклеиновых

кислот, используется упрощенная модель, в которой не рассматриваются промежуточные и дополнительные состояния - приближение “все-или-ничего”. В случаях, рассмотренных в диссертации, это приближение везде хорошо сработало. Для полного понимания универсальности разработанного метода не хватает указания условий его применимости. Насколько разработанный метод универсален и какие у него ограничения? Автор решает уравнения материального баланса (20)-(21) численными методами, используя стехиометрические концентрации олигонуклеотидов в качестве граничных условий, однако, численными методами это уравнение можно решать и в общем виде для произвольных концентраций, что может оказаться более удобно и универсально с экспериментальной точки зрения. Кроме того избыток коротких нуклеотидов по сравнению со стехиометрическим количеством, по-видимому, лучше подходит для приближения “всё-или-ничего”. Почему были использованы стехиометрические количества?

2. При проведении молекулярно-динамических расчетов в необходимых деталях не описан выбор конформеров и изомеров глицин-морфолиновых олигомеров по морфолиновому кольцу.

3. При компьютерном моделировании комплексов глицин-морфолиновых пентааденилатов с ДНК использовалась В-форма дуплекса в качестве стартовой гипотетической структуры. Почему в этом случае была взята только одна форма и почему именно В?

Сделанные замечания не затрагивают основных результатов и выводов диссертации и не снижают общего положительного впечатления от рассматриваемой диссертации, как о законченной научно-исследовательской работе, выполненной на современном научно-техническом уровне.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Голышева В.М. “Развитие физико-химических подходов для рационального дизайна новых производных нуклеиновых кислот” представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу. Научные положения и выводы автора не вызывают сомнений. Результаты оригинальны, достоверны и отличаются практической значимостью и новизной. Диссертация в полной мере соответствует паспорту специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

Считаю, что диссертационная работа Голышева Виктора Михайловича «*Развитие физико-химических подходов для рационального дизайна новых производных нуклеиновых кислот*» соответствует требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям, в том числе отвечает критериям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в ред. Постановлений Правительства РФ от 21.04.2016 № 335, от 02.08.2016 № 748, от 29.05.2017 № 650, от 28.08.2017 № 1024, от 01.10.2018 № 1168, от 20.03.2021 № 426, от 11.09.2021 № 1539), а ее автор, Голышев Виктор Михайлович, заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества.

Официальный оппонент

Шернюков Андрей Владимирович

кандидат химических наук

специальность 01.04.17 - химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества

старший научный сотрудник

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова
Сибирского отделения Российской академии наук (НИОХ СО РАН)
630090. Российская Федерация. г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д.9
Тел. (383)330-88-50,

Электронная почта: andreysh@nioch.nsc.ru

11.03.2022

Согласен на включение моих персональных данных в документы,
связанные с работой диссертационного совета, и их дальнейшую обработку.

Подпись Шернюкова А.В. заверяю

Ученый секретарь НИОХ СО РАН

к.х.н.

11.03.2022



Р.А. Бредихин