

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Соколова Андрея Сергеевича,
представленную на соискание ученой степени
кандидата биологических наук на тему:
«Хоминг-эндонуклеаза SegD бактериофага T4:
биохимическая и функциональная характеристика»,
по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

Несмотря на то, что с момента открытия эндонуклеаз рестрикции прошло уже больше сорока лет, и они стали незаменимым инструментом молекулярной биологии, генетики и биотехнологии, свойства этих ферментов продолжают интенсивно изучаться, что позволяет открывать их новые особенности и закономерности. Относительно недавно, например, было установлено, что некоторые эндонуклеазы стимулируют нематричный синтез ДНК, определяя нуклеотидную последовательность продуктов реакции, а хоминг-эндонуклеазы провоцируют мобильность собственных генов, что имеет огромное значение для эволюционной биологии. Диссертационная работа Соколова Андрея Сергеевича посвящена изучению хоминг-эндонуклеазы SegD фага T4. Её **актуальность** обусловлена не только большим объёмом фактических данных, характеризующих новую эндонуклеазу, но также участием SegD в генетическом обмене между T-четными бактериофагами, что представляет особый интерес в связи с возросшей потребностью более широкого использования фаготерапии в качестве альтернативы антибиотикам.

Научная новизна. Диссертационная работа Соколова Андрея Сергеевича является продолжением многолетних исследований, проводимых в Лаборатории энзимологии генетических процессов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН по изучению нуклеаз бактериофага T4. Кроме функциональной характеристики SegD, фактической новизной работы является характеристика структурно-функциональной организации генов 23 - 24 у 14 T-четных бактериофагов и обнаружение *segD* у фагов RB55, RB59 и T6.

Диссертационная работа Андрея Сергеевича оформлена по традиционному плану, она изложена на 100 страницах печатного текста и содержит Введение, Обзор литературы, Методы исследования и Материалы, Результаты и Обсуждение, Заключение, Выводы, Список сокращений и Список литературы, включающий 137 публикации. Содержащаяся в диссертационной работе информация иллюстрирована 26 рисунками и пятью таблицами.

В относительно объёмном «**Введении**» (4 страницы), кроме знакомства читателя с хоминг-эндонуклеазами, как с особым классом сайт-специфических эндодезоксирибонуклеаз, автором обоснована актуальность проведённого исследования, а также сформулированы цель и конкретные задачи проделанной работы. В отдельных разделах адекватно отображены новизна полученных результатов, их научно-практическая ценность, а также перечислены выносимые на защиту положения и приведена информация о степени опубликованности полученных данных.

Обзор литературы состоит из трех частей, в первой из которых изложена информация о семействе Т-четных бактериофагов, особенностях их структуры и развития, в том числе описано явление частичного исключения генетических маркеров при скрещивании фагов Т4-типа. Вторая часть закономерно посвящена описанию хоминг-эндонуклеаз, их классификации и биологической роли, включая позиционирование «хоминга», как особого типа мобильности генетического материала. В третьей части описаны хоминг-эндонуклеазы бактериофага Т4. Обсуждаются интрон-кодируемые и свободностоящие хоминг-эндонуклеазы фага Т4, в том числе сайт-специфические эндонуклеазы Mob- и Seq-групп. Обзор в точности соответствует сути проделанной работы, он хорошо структурирован, информативен и легко читается, хотя некоторое недоумение вызвали оставленные англоязычные обозначения на Рис. 2, 3, 6, 8 и 9, а в подписи к Рис. 1 не оказалось ссылки на первоисточник.

Глава «**Материалы и методы**» содержит два раздела, в первом из которых перечислены использованные в работе реактивы, в том числе олигонуклеотиды; приведён состав буферов и растворов, а также указано ключевое оборудование. В таблице 2.1.1. перечислены 9 бактериальных штаммов и 23 разных бактериофага, а также указано, для каких целей они были использованы. Пять полученных в работе плазмидных конструкций указаны и охарактеризованы в Таблице 2.1.2. которая также содержит список других использованных для исследования векторов. Во втором разделе методической части, кроме обычных лабораторных и генно-инженерных методов, таких как наработка плазмид и получение их рекомбинантных производных, электрофоретическое разделение белков и нуклеиновых кислот и пр., детально описаны менее распространённые методы, такие как «скрещивание фагов и плазмид» и разделение фрагментов ДНК в инверсионных полях (пульс-электрофорез), а также методов специально адаптированных для данного исследования, таких как идентификация точек расщепления SegD и границ узнаваемого SegD мотива. Методическая часть работы замечаний не вызывает, а полнота и стиль изложения свидетельствуют о высоком методическом уровне диссертанта.

Глава «**Результаты и Обсуждения**» состоит из 9 разделов. В них последовательно представлены результаты, полученные на каждом этапе работы, а также их анализ. На первом этапе, автором было исследовано распределение гена *segD* среди фагов, родственных Т4. Основываясь на сравнении размеров PCR-продуктов, полученных с праймерами, комплементарными соседним генам, и на сравнительном анализе нуклеотидной последовательности ампликонов, автору удалось установить, что идентичные фагу Т4 гены *segD* присутствуют у фагов RB55, RB59, а в геноме фага Т6 в контексте *segD* имеется только одна синонимичная замена. Результаты этой части сформулированы в качестве первого вывода диссертации.

Следующие два раздела посвящены наработке и очистке SegD и исследованию биохимических свойств эндонуклеазы SegD. Автор разработал простую и эффективную схему получения белка SegD, позволившую минимизировать его токсичность для продуцирующих клеток и попадания в тельца включения. Осталось, правда, не понятным, почему в качестве контроля для оценки уровня индукции гена *segD* в клетках *E.coli* BL21(DE3)/pLysE/pSDET-19mod использовали лизат не индуцированных клеток BL21(DE3)/pLysE/pET-19mod, а не тот же трансформант, несущий плазмиду pSDET-19mod? Не очень понятна также логистика удаления TEV-протеазы из очищенных препаратов SegD, которую добавляли, чтобы отрезать His-tag с рекомбинантного SegD. После этого, лишённый His-tag-метки SegD получали в исключённом объёме с использованием металл-хелатной аффинной хроматографии, но TEV-протеаза тоже содержит трек из гистидинов, который подвержен автопротеолизу. Это значит, что вместе с SegD должна элюироваться и протеаза. Её протеолиз можно снизить с использованием некоторых приёмов, но не понятно, использовал ли их автор, или конечные препараты целевого белка содержали примесь лишённой His-tag TEV-протеазы, электрофоретическая подвижность которой ($MW = 27$ kDA) не отличается от подвижности исследованного в данной работе SegD.

Андреем Сергеевичем были исследованы физико-химические и функциональные свойства эндонуклеазы SegD. Было установлено, что фермент активен в широком диапазоне значений pH, с максимумом при pH 7,0 - 7,5. Для максимальной активности оказался необходим Mg^{2+} , а ионы Ca^{2+} и Zn^{2+} её снижали. Температурный оптимум SegD был обнаружен при $\sim 30^{\circ}C$ и установлено, что присутствие альбумина и Тритона X-100 увеличивают стабильность SegD. Этот типичный набор параметров, требуемых для характеристики нового белка, адекватно отражён во втором выводе.

В следующих четырёх разделах диссертации отражены результаты картирования сайтов гидролиза SegD в фаговых геномах, их позиционирования относительно распознаваемых мотивов, определения последовательности этих мотивов и зависимости гидролиза от природных модификаций фаговой ДНК. Было установлено, что SegD узнает сайт протяженностью 16 п.н. и гидролизует его с образованием 3'-выступающих концов в гликозилированных и негликозилированных фаговых геномах. Соответствующая последовательность была обнаружена у всех 29-ти исследованных в работе T4-родственных бактериофагов, в том числе таких, которые содержат ген *segD*. Это не типично для хоминг-эндонуклеаз. Поэтому было проверено предположение, что ген *segD* не экспрессируется при фаговой инфекции, но оно не подтвердилось и, следовательно, удивительной особенностью SegD является способность по каким-то причинам игнорировать мишени в собственных геномах. Результаты, полученные в этой серии экспериментов сформулированы в третьем, четвертом и пятом выводе, а задачей последнего этапа стало выяснение причин, по которым ген *segD* и сайты связывания SegD могут находиться в одном геноме.

Для этого была определена частота наследования гена *segD* потомством фагов смешанных инфекций и проанализирована способность SegD инициировать рекомбинационные процессы в удаленном локусе при введении в него сайта гидролиза эндонуклеазы SegD. Для этих серий экспериментов, Андрей Сергеевич получил 5 различных вариантов бактериофага T4 с генетическими изменениями в исследуемых областях. В результате, было установлено, что в условиях природного уровня экспрессии, эндонуклеаза SegD не способна инициировать мобильность собственного гена, даже в случае, если ее сайт узнавания искусственно нарушен в геноме донора. Однако мобильность *seqD*, также как генетическую конверсию в удаленном локусе по искусственно введенному сайту удалось зарегистрировать в присутствии продуцируемого с плазмиды рекомбинантного белка SegD. Это позволило автору сделать шестой вывод о том, что для инициации мобильности требуется повышенный, в сравнении с природным, уровень эндонуклеазы SegD в клетке.

В заключительной главе диссертации подведены итоги проведенной работы, безусловным достоинством которой является логическая продуманность и результативность всех экспериментальных серий. Благодаря адекватности использованных методов достоверность полученных Соколовым А.С. данных не вызывает никаких сомнений. Все выносимые на защиту выводы базируются на результатах очень высокого качества и, поэтому, обоснованы и достоверны. Автор полностью выполнил намеченные эксперименты и решил все поставленные задачи.

Диссертационная работа написана понятным литературным языком, хорошо структурирована, снабжена рисунками и таблицами. В работе довольно много опечаток (например, на стр. 8, 12, 16, ... 68, 71, 80) и стилистических погрешностей (например, на стр. 59 и 63). Это несколько не снижает прекрасного впечатления от самой работы, которая заслужено вызывает большой интерес.

В целом, диссертационная работа Соколова А.С. «Хоминг-эндонуклеаза SegD бактериофага T4: биохимическая и функциональная характеристика» является прекрасно спланированным, замечательно реализованным и полностью завершённым в рамках поставленных задач научным исследованием. К ней нет принципиальных замечаний. По результатам работы опубликовано 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК и трое тезисов докладов, сделанных на российских и международных конференциях. Автореферат отражает содержание диссертации. Актуальность, научная новизна и практическая значимость проведенных в работе исследований полностью соответствует п.9 «Положения о присуждении ученой степени», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 29.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Соколов Андрей Сергеевич, безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 –

Филиал Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Институт
биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова

старший научный
лаборатории им

Ламан Александр Георгиевич