

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

На диссертационную работу А.С. Соколова на тему: «Хоминг-эндонуклеаза SegD бактериофага Т4: биохимическая и функциональная характеристика», представленную к защите на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

по специальности:

03.01.03 – «молекулярная биология»

Диссертационная работа Соколова А. С. посвящена исследованию свойств хоминг-эндонуклеазы SegD бактериофага Т4, и изучению роли данной эндонуклеазы в генетическом обмене между Т-четными бактериофагами. В этом отношении работа касается актуальной области современной молекулярной биологии и вирусологии и имеет фундаментальное значение.

Хоминг-эндонуклеазы являются особым классом сайт-специфических эндодезоксирибонуклеаз. Данные ферменты инициируют перенос собственных генов и фланкирующих областей в безнуклеазные варианты аллеля родственных геномов. Интерес к ферментам данного класса обусловлен их уникальными свойствами. Хоминг-эндонуклеазы, в отличие от эндонуклеаз рестрикции, узнают протяженные (до 40 п.н.) последовательности ДНК. Благодаря этому свойству, хоминг-эндонуклеазы могут служить хорошим инструментом в работе с целыми геномами, в частности, для создания систем эффективного внесения направленных мутаций. Поскольку в настоящее время актуальной задачей фундаментальных и прикладных исследований в области современной молекулярной биологии является искусственное изменение геномов, актуальность выбранной темы не подлежит сомнению.

В геноме бактериофага Т4 обнаружено 15 генов хоминг-эндонуклеаз, занимающих около 15 т.п.о., что составляет 11 % фагового генома. Высокая плотность данных генов в этом и ряде других геномов ставит вопросы о роли хоминг-эндонуклеаз в эволюции бактериофагов. Показано, что эти ферменты, помимо направленного переноса собственных генов, могут вызывать и перенос примыкающих к гену хоминг-эндонуклеазы участков ДНК и, тем самым, инициировать обмен фрагментами ДНК между родственными фагами. В связи с этим интересна роль хоминг-эндонуклеаз в функционировании генома бактериофага Т4 и других похожих геномов.

Ранее была проведена работа по характеристике большинства известных хоминг-эндонуклеаз бактериофага Т4. Тем не менее, в литературе отсутствовала какая-либо информация о функции и свойствах белка SegD, предположительно, относящегося к представителям хоминг-эндонуклеаз. Также не было данных об экспрессии гена *segD* и его мобильности. Данная работа посвящена изучению предполагаемой эндонуклеазы SegD бактериофага Т4.

На первом этапе представленной работы автором диссертации было проведено исследование распространенности гена *segD* среди Т-четных фагов. Андрей Сергеевич определил нуклеотидную последовательность области генов 23 - 24 у 14-ти Т-четных бактериофагов. Кроме этого, автор проанализировал имеющиеся базы данных и установил, что ген *segD*, помимо фага Т4, присутствует у фагов RB55, RB59, Т6, Т4Т и ECML-134, что расширяет наши знания о геномах фагов родственных Т4.

На следующем этапе работы автор разработал схему очистки белка SegD. Это позволило выделить белок и установить, что SegD является Mg^{2+} -зависимой сайт-специфической эндодезоксирибонуклеазой. Далее были охарактеризованы ферментативные свойства белка и идентифицирован сайт гидролиза эндонуклеазы SegD в геноме Т-четных фагов. Так же Андрей Сергеевич установил, что исследуемая эндонуклеаза SegD способна гидролизовать природную ДНК Т-четных фагов, содержащую гликозилированные остатки гидроксиметилцитозина. Автор отмечает, что такая ситуация является необычной, поскольку большинство эндонуклеаз рестрикции не способны гидролизовать ДНК Т-четных бактериофагов из-за наличия природных модификаций блокирующих гидролиз. Последовательность ДНК, узнаваемая и гидролизуемая эндонуклеазой SegD, была обнаружена автором в геномах всех проанализированных фагов. Эта ситуация уникальной, поскольку, как правило, предпочтительный сайт гидролиза хоминг-эндонуклеазы располагается в фаге, не содержащем ген хоминг-эндонуклеазы.

Андрей Сергеевич изучил способность эндонуклеазы SegD инициировать мобильность собственного гена. Было показано, что в условиях природного уровня экспрессии эндонуклеаза SegD не способна инициировать мобильность собственной ОРС. Тем не менее, при искусственном увеличении количества эндонуклеазы SegD в клетке, она инициирует мобильность собственного гена, а также генетическую конверсию в удаленном локусе по искусственно введенному сайту гидролиза. Таким образом, выступая в роли

хоминг-эндонуклеазы, либо инициатора рекомбинационного процесса в удаленном локусе.

Подытожившая вышесказанное, в этом исследовании описана новая сайт-специфическая эндонуклеаза бактериофага T4 и охарактеризованы ее свойства. Полученные в настоящей работе данные дополняют информацию о хоминг-эндонуклеазах и, в частности, о ферментах, относящихся к GIY-YIG - семейству белков.

Диссертационная работа содержит достаточное количество исходных данных, имеет пояснения, рисунки, графики. Подробно описана глава “Материалы и методы”. При желании, все результаты могут быть воспроизведены. По каждой главе и работе в целом имеются выводы.

Полученные в настоящей работе результаты отличаются новизной и актуальностью и могут быть использованы для прикладных исследований в частности для создания на основе эндонуклеазы SegD новых систем направленного переноса генетической информации. Основные этапы работы, выводы и результаты представлены в автореферате.

Структура диссертации

Диссертационная работа построена по традиционному плану. Она состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы.

Работа изложена на 100 страницах машинописного текста, включает 26 рисунков и 5 таблиц, список из 146 использованных литературных источников. Материал изложен логично, последовательно.

Раздел «**Введение**» содержит обоснование актуальности исследования.

Обзор литературы содержит 3 раздела, посвященных семейству T-четных бактериофагов, хоминг-эндонуклеазам и, отдельно, хоминг-эндонуклеазам бактериофага T4 и родственных фагов. Обзор содержит детальный анализ современной литературы по проблеме и помимо актуального состояния дает сведения об историческом развитии этих исследований. Обзор литературы является важной частью работы, обосновывающей поставленную цель и задачи исследования и позволяющей лучше понять выбранные диссертантом пути решения стоявших перед ним задач.

Методы исследования и материалы. Методическая часть рецензируемой работы содержит полное изложение примененных методов и подходов, достаточное для воспроизведения результатов исследования.

Раздел «**Результаты и обсуждение**» занимает 26 страниц. Результаты исследования изложены логично и убедительно, в надлежащей степени проиллюстрированы рисунками. Одновременно с изложением полученных результатов работы автор их анализирует и проводит постоянное сравнение с результатами других авторов, посвященных поиску решений сходных вопросов.

Выводы. По результатам работы сделано 6 выводов. Они грамотно сформулированы и адекватно отражают основные научные достижения диссертанта в ходе данного исследования, а также их научную и практическую значимость.

Степень представленности работы в публикациях.

Основные результаты диссертационной работы достаточно полно отражены в 3 работах в рецензируемых научных изданиях.

Научное и практическое значение работы состоит в том, что полученные в данной работе результаты хотя и имеют, в основном фундаментальное значение, однако некоторые из них могут найти и практическое применение. Изученная в данной работе эндонуклеаза SegD может быть использована для создания нуклеаз с заданной специфичностью.

Данные о мобильности гена *segD* фага T4 могут быть использованы для изучения механизмов сайт-специфической рекомбинации и создания новых систем направленного переноса и замещения генетической информации. Штамм-продуцент эндонуклеазы SegD и разработанная схема очистки могут быть использованы для получения препаративных количеств белка, необходимых, например, для определения пространственной структуры данной сайт-специфической эндонуклеазы.

Замечания по работе.

Серьезных недостатков в работе нет, но можно отметить большое количество орфографических ошибок и наличие узкоспециализированных терминов. В тексте присутствуют небрежности в представлении материала, что затрудняет его восприятие.

1. На стр.2, в оглавлении 2 раза подряд присутствует написание «хоминг-эндонуклеаз» (п.п. 1.3 и 1.3.1).

2. На стр.5, в разделе «Цель и задачи исследования»:

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

В соответствии с поставленной целью работы были сформулированы следующие задачи:

3. На стр.8, в разделе «Обзор литературы»: «Темнее менее», что следует понимать, как «тем не менее»; «идентичночти».
4. Слово «представители», написанное как «предстовители», встречается на стр. 9 и 22.
5. На стр.27 в подписи к рис. 7: «распознающие мотивы», «адоптирован».
6. На стр. 30: «разолваза», двумя строчками ниже – «резолваза».
7. На стр. 31: «подовления роста клеток».
8. На стр. 32: «фенномене», «сегодняшний момент», слово интрон на этой же странице в двух вариантах: «инрон» и «итрон».

На стр. 37: «Таким образом, ген *mobE* - единственный предстовитель *mob*-генов, для которо была показана мобильность и установлено, что кодируемый им белок обладает нуклеазной активностью» и так далее.

9. описание к рисунку 4 находящегося на стр. 21 приведено на стр.22. На рисунке 9 стр. 35 в обозначении к рисунку фигурируют как английские, так и русские буквы.
10. Рисунки печатного варианта диссертации распечатаны на монохромном принтере, поэтому вызывают изумление подписи: «**Рис. 1. Генетическая карта фага Т4.** Рамками красного цвета выделены гены свободно-стоящих сайт-специфических эндонуклеаз семейства Seg и предполагаемых сайт-специфических эндонуклеаз семейства Mob. Рамками синего цвета выделены гены хоминг-эндонуклеаз, кодируемые интронами». Хотя, в электронном варианте диссертации все рисунки цветные.
11. Список литературы не пронумерован, что затрудняет работу с диссертацией, хотя, понятно, что облегчает её написание.

Вместе с тем, стоит отметить, что указанные замечания не снижают ценность диссертационной работы и не влияют на результаты, полученные в работе. По теме диссертации опубликованы три статьи в журналах, рекомендованных ВАК. Содержание автореферата и печатных работ соответствует материалам диссертации.

Автор решил все поставленные перед ним задачи. Основная часть работы выполнена лично автором на высоком научном и методическом уровне. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений, выводы логично вытекают из полученных данных.

В целом, диссертационная работа А. С. Соколов «Хоминг-эндонуклеаза SegD бактериофага T4: биохимическая и функциональная характеристика» полностью отвечает требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК России, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – “молекулярная биология”.

Руководитель лаборатории
«Молекулярная генетика»
Института вирусологии им. Д.И.Ивановского
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи»
Минздрава России,
д.б.н.

Прилипов Алексей Геннадьевич

123098, Москва, ул. Гамалеи 16. e-mail: a_prilipov@mail.ru
телефон: +7(499) 190-28-51

Подпись А.Г. Прилипова заверяю,
Ученый секретарь ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи»
Минздрава России

П.М.Х. никова

Сведения об официальном оппоненте по кандидатской диссертации Соколова Андрея Сергеевича на тему:

«Хоминг-эндонуклеаза *SegD* бактериофага T4: биохимическая и функциональная характеристика»

по специальности: 03.01.03 – Молекулярная биология (биологические науки)

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Шифр специальности в совете	Основные научные труды
Прилипов Алексей Геннадьевич	Российская Федерация	Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Федерального государственного бюджетного учреждения научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи и Министерства Здравоохранен	Доктор биологических наук	03.02.02 – вирусология, 03.01.03 – молекулярная биология	Prilipov A, Phale PS, Koebnik R, Widmer C, Rosenbusch JP. Identification and characterization of two quiescent porin genes, pmrC and omrN, in <i>Escherichia coli</i> BE. J Bacteriol. 1998 Jul;180(13):3388-92 Prilipov A, Phale PS, Van Gelder P, Rosenbusch JP, Koebnik R. Coupling site-directed mutagenesis with high-level expression: large scale production of mutant porins from <i>E. coli</i>. FEMS Microbiol Lett. 1998 Jun 1;163(1):65-72. Derouiche R, Gavioli M, Bénédicti H, Prilipov A, Lazdunski C, Loubès R. TolA central domain interacts with

		ия Российской Федерации заведующий лабораторией молекулярной генетики			Escherichia coli porins. EMBO J. 1996 Dec 2;15(23):6408-15. Saint N, Prilpov A, Hardmeyer A, Lou KL, Schirmer T, Rosenbusch JP. Replacement of the sole histidyl¹ residue in OmpF porin from E. coli by threonine (H21T) does not affect channel structure and function. Biochem Biophys Res Commun. 1996 Jun 5;223(1):118-22. Lou KL, Saint N, Prilpov A, Rummel G, Benson SA, Rosenbusch JP, Schirmer T. Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size. I. Crystallographic analysis. J Biol Chem. 1996 Aug 23;271(34):20669-75. Van Gelder P, Dumas F, Bartoldus I, Saint N, Prilpov A, Winterhalter M, Wang Y, Philippsen A, Rosenbusch JP, Schirmer T. Sugar transport through maltoporin of Escherichia coli: role of the greasy slide. J Bacteriol. 2002 Jun;184(11):2994-9
--	--	--	--	--	---

					Ilyinskii PO, Meriin AB, Gabai VL, Usachev EV, Prilipov AG, Thoidis G, Shneider AM. The proteosomal degradation of fusion proteins cannot be predicted from the proteosome susceptibility of their individual components. Protein Sci. 2008 Jun;17(6):1077-85. doi: 10.1110/ps.083443908. Epub 2008 Apr 14 Katsy EI, Prilipov AG. Mobile elements of an Azospirillum brasilense Sp245 85-MDa plasmid involved in replicon fusions. Plasmid. 2009 Jul;62(1):22-9. doi: 10.1016/j.plasmid.2009.02.003. Epub 2009 Feb 26. Varich NL, Sadykova GK, Prilipov AG, Kochergin-Nikitsky KS, Kusch AA, Masalova OV, Klimova RR, Gitelman AK, Kaverin NV. Antibody-binding epitope differences in the nucleoprotein of avian and mammalian influenza A viruses. Viral Immunol. 2011 Apr;24(2):101-7. doi: 10.1089
--	--	--	--	--	--

				Varich NL, Sadykova GK, Prilipov AG, Kochergin-Nikitky KS, Webster RG, Kaverin NV. Location and architecture of an antibody-binding site of influenza A virus nucleoprotein. Arch Virol. 2014 Jun;159(6):1493-7. doi: 10.1007/s00705-013-1952-8. Epub 2013 Dec 20. Filip'cheva Y, Shelud'ko A, Prilipov A, Telesheva E, Mokeev D, Burov A, Petrova L, Katsy E. Chromosomal flhB1 gene of the alphaproteobacterium Azospirillum brasilense Sp245 is essential for correct assembly of both constitutive polar flagellum and inducible lateral flagella. Folia Microbiol (Praha). 2017 Aug 15. doi: 10.1007/s12223-017-0543-6. Прилипов А.Г., Кинни Р.М., Самохвалов Е.И., Сэведж Г., Альховский С.В., Тсучия Р., Громашевский В.Д., Садькова Г.К., Шатагов А., Вышемирский О., Усачев Е., Мохонов В., Воронина А., Бутенко А.М., Ларичев В.Ф., Жуков А., Ковтунов А., Гублер Д., Львов Д.К. Анализ новых вариантов
--	--	--	--	---

					вируса лихорадки Западного Нила // Вопросы вирусологии. 2002. №4. С. 36-41. Прилипов А.Г., Самохвалов Е.И., Львов Д.К., Громашевский В.Л., Бутенко А.М., Вышемирский О.И., Ларичев В.Ф., Гайдамович С.Я, Хуторецкая Н.В., Воронина А.Г., Новиков Д.В., Мохонов В.В. Альховский С.В. Генетический анализ вирусов лихорадки Западного Нила, выделенных на юге Русской равнины // Вопросы вирусологии. 2001. №1. С. 8-12. Лаврентьев М.В., Прилипов А.Г., Львов С.Д., Львов Д.К. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей штаммов вируса Хатанга – нового представителя серокомплекса Калифорнийского энцефалита, изолированных в различных регионах Российской Федерации // Вопросы вирусологии. 2008. №6. С. 25-29.
--	--	--	--	--	---

29 ноября 2018 г.

заведующий лабораторией молекулярной генетики, д.б.н.
Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского

ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи»

Минздрава России

123098, Москва, ул. Гамалеи, д.18

тел. (499) 190-28-51

e-mail: a_priipov@mail.ru

А.Г. Прилипов

Подпись А.Г. Прилипова заверяю,
Ученый секретарь ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи»
Минздрава России



29 ноября 2018 г.
заведующий лабораторией молекулярной генетики, д.б.н.
Институт вирусологии им. Д.И.Ивановского
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи»
Минздрава России
123098, Москва, ул. Гамалеи, д.18
тел. (499) 190-28-51
e-mail: a_pripov@mail.ru

Прилипов

Подпись А.Г. Прилипова заверяю,
Ученый секретарь ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи»
Минздрава России

Вникова