



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@imb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

21.11.2018 № 12312-2171

На № 417/472 от 16.10.2018

Заместитель

«УТВЕРЖДАЮ»

лекулярной биологии

А. Энгельгардта РАН

орр. РАН В.Л.Карпов.

15 ноября 2018 г.

ОТЗЫВ

Ведущей организации на диссертацию Соколова Андрея Сергеевича

«Хоминг-эндонуклеаза SegD бактериофага T4: биохимическая и функциональная характеристика», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Актуальность темы выполненной работы

Диссертационная работа А. С. Соколова является исследовательской работой, которая посвящена изучению хоминг-эндонуклеазы SegD бактериофага T4: ее биохимических свойств, картированию сайта гидролиза, а также способности инициировать генетическую рекомбинацию между T-четными бактериофагами.

Хоминг-нуклеазы – это особая группа сайт-специфических эндонуклеаз, узнающих протяженные вырожденные последовательности ДНК. Они кодируются открытыми рамками считывания, расположенными в составе интронов группы I, интеинов, а также отдельно стоящими (free-standing) генами. Для многих эндонуклеаз данной группы показана способность инициировать хоминг: процесс переноса кодирующей её ОРС и фланкирующих последовательностей в безнуклеазный аллель близкородственного организма. Данный процесс инициируется внесением хоминг-

эндонуклеазой разрыва в ДНК «безнуклеазного» аллеля, который затем репарируется при помощи гомологичной рекомбинации.

Интерес к данной тематике обусловлен, с одной стороны, участием хоминг-эндонуклеаз в обмене генетической информацией между близкородственными организмами и, как следствие, их ролью в эволюционном процессе. С другой стороны, они интересны как белки, узнающие протяженные, длиной до 40 п.н., последовательности ДНК. Ведь именно глубокое понимание механизмов узнавания белком ДНК необходимо для разработки эффективных инструментов, позволяющих проводить различные манипуляции с геномной ДНК, в том числе её редактирование. В свете вышесказанного не вызывает сомнения актуальность темы диссертационной работы Соколова А.С.

Научная новизна и достоверность выводов

В диссертационной работе А. С. Соколова исследовано распространение гена *segD* среди Т-четных бактериофагов. Установлено, что ген *segD*, помимо Т4, присутствует у фагов RB55, RB59 и Т6, тогда как у большинства фагов данный ген отсутствует. Автором разработана эффективная методика по экспрессии гена *segD* в *E. coli* и выделению рекомбинантного фермента. Это позволило охарактеризовать хоминг-эндонуклеазу SegD бактериофага Т4: идентифицирован природный сайт гидролиза и изучены биохимические свойства этого фермента, а также показана экспрессия гена *segD* при фаговой инфекции. В ходе исследования было установлено, что сайт гидролиза эндонуклеазы SegD сохраняется в геномах *segD*⁺ фагов, что не типично для хоминг-эндонуклеаз: как правило, инсерция эндонуклеазного гена сопровождается нарушением предпочтительного сайта гидролиза кодируемого им фермента. В диссертационной работе установлено, что эндонуклеаза SegD не способна инициировать хоминг собственного гена при скрещивании Т-четных бактериофагов. В исследованиях на модели *rII*-локуса показано, что эндонуклеаза SegD не способна инициировать генетическую рекомбинацию между фагами вне зависимости от положения сайта SegD в геноме. Для инициации вышеуказанных процессов требуется повышенный, по сравнению с природным, уровень белка SegD в клетке.

Результаты, представленные Соколовым А.С в данной диссертационной работе, развивают современные представления о роли хоминг-эндонуклеаз в генетическом обмене у Т-четных бактериофагов. Прикладное значение работы обусловлено возможностью использования эндонуклеазы SegD для создания систем направленного переноса генетической информации.

Достоверность полученных при выполнении данной диссертационной работы результатов не вызывает сомнений: эксперименты грамотно спланированы и проведены в нескольких повторах, что позволило провести статистическую обработку полученных данных. По результатам выполненной работы сформулировано 6 выводов, они содержательны, информативны и полностью соответствуют поставленным задачам.

Рекомендации по использованию результатов и выводов

Результаты и выводы диссертации Соколова А.С. целесообразно использовать для проведения фундаментальных исследований научным лабораториям и группам, занимающимся исследованиями хоминг-нуклеаз и других ДНК-модифицирующих ферментов. Полученные Соколовым А.С. результаты могут найти и прикладное применение, например, для создания нуклеаз с заданной специфичностью, а также разработки систем для направленного переноса генетической информации.

О содержании диссертации

Диссертационная работа Соколова А.С. написана по традиционному плану и состоит из глав «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список цитируемой литературы». Диссертационная работа изложена на 99 страницах печатного текста. Материал иллюстрирован 26 рисунками и 5 таблицами, которые в полной мере отражают теоретическую базу и основные результаты экспериментов. Библиографический указатель содержит 137 источников.

В обзоре литературы, соответственно теме исследования, в достаточной мере освещается современное состояние изучаемой проблемы. Автором проанализирована обширная отечественная и зарубежная литература, посвященная особенностям структуры и развития бактериофага Т4, семейству Т-четных бактериофагов и особенностям наследования генетических маркеров при их скрещивании. Андрей Сергеевич подробно остановился на описании хоминг-эндонуклеаз, их классификации, структуре и механизмах узнавания и катализа ДНК, а также на современных представлениях о механизмах хоминга. В заключительных главах раздела изложены современные данные о хоминг-эндонуклеазах бактериофага Т4. Обзор литературы дает исчерпывающее представление об опубликованных к настоящему времени данных по тематике диссертации.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробное описание использованных

экспериментальных подходов. Характер изложения предполагает возможность воспроизведения методов при постановке аналогичных экспериментов.

В диссертационной работе четко сформулированы цель и задачи исследования. Для решения поставленных задач автором использован широкий спектр современных методов молекулярной биологии, генной инженерии, биохимии и биоинформатики. Основная часть работы выполнена автором лично.

В разделе «Результаты экспериментов и их обсуждение» отражена большая работа, проделанная диссертантом и представляющая несомненный интерес. Стоит отметить, что экспериментальная часть исследования построена таким образом, что каждый последующий раздел «опирается» на результаты предыдущего и является его логическим продолжением. Данный раздел полностью отражает логику исследования, состоит из 9 подразделов и условно может быть разделен на две большие части. Первая часть исследования посвящена анализу структуры области генов 23 и 24 Т-четных бактериофагов, в которой у фага Т4 расположен ген *segD*. В этой части работы автор также приводит результаты по получению очищенного препарата эндонуклеазы SegD, установлению сайта гидролиза и биохимической характеристике фермента. Определенную ценность представляют данные, указывающие на то, что эндонуклеаза SegD нечувствительна к природным модификациям ДНК Т-четных фагов, содержащей гликозилированные остатки гидроксиметилцитозина. Такие свойства открывают перспективы использования данного фермента для манипуляций с геномной ДНК как *in vitro*, так и *in vivo*. Вторая часть раздела посвящена анализу способности эндонуклеазы SegD инициировать хоминг собственного гена, а также генетической рекомбинации между Т-четными фагами в *rII*-локусе, находящемся на удалении от собственного гена. При выполнении этой части работы Андрей Сергеевич использовал методы молекулярной и классической генетики. В результате было установлено, что эндонуклеаза SegD при скрещивании Т4-родственных фагов не способна инициировать генетические обмены между ними, что отличает её от большинства других охарактеризованных хоминг-эндонуклеаз Т4. Автором достаточно убедительно показано, что это обусловлено относительно невысоким уровнем продукции данной эндонуклеазы при фаговой инфекции: в условиях повышенного содержания SegD в клетках с высокой частотой происходил как хоминг собственного гена, так и генетическая рекомбинация между фагами в сайте гидролиза SegD, встроенном в *rII*-локус Т4.

В целом диссертация создает впечатление законченного и современного исследования. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Этапы

работы четко спланированы, выводы корректно сформулированы, логически вытекают из полученных результатов и полностью обоснованы. Экспериментальная часть и обзор литературы хорошо проиллюстрированы.

Результаты диссертационной работы представлены на международных и российских конференциях и опубликованы в 3 печатных работах в журналах, рекомендованных ВАК.

Несмотря на вышесказанное, работа не лишена некоторых недостатков. В экспериментах по анализу способности SegD инициировать генетическую рекомбинацию между Т-четными фагами не приведены данные, на сколько, по сравнению с природным, повышен уровень продукции SegD в клетке при использовании штамма-продуцента в качестве хозяина. Кроме того, автору удалось идентифицировать и охарактеризовать только один сайт хоминг-эндонуклеазы SegD, тогда как для данного класса ферментов характерна вырожденность сайтов узнавания. В связи с этим возникает вопрос о специфичности исследуемого фермента, что практически осталось без внимания автора при обсуждении результатов работы. Также в качестве замечания можно отметить, что обозначения некоторых величин не переведены на русский язык, в тексте встречаются ошибки, опечатки и жаргонные выражения. Некоторые подписи к рисунку представлены на следующем после рисунка листе, что несколько затрудняет восприятие материала. Это же касается и ряда таблиц. Вместе с тем, стоит отметить, что указанные замечания не являются принципиальными и не снижают научную и практическую значимость работы. Соискателю, несомненно, удалось успешно решить поставленные перед ним задачи.

Заключение

Диссертационная работа Андрея Сергеевича Соколова «Хоминг-эндонуклеаза SegD бактериофага Т4: биохимическая и функциональная характеристика», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельным законченным научно-квалифицированным исследованием по актуальной теме, результаты которой имеют существенное значение для современной генетики, биохимии и молекулярной биологии.

По актуальности, научной новизне, фундаментальной и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Соколова Андрея Сергеевича соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения учёной степени», утвержденного постановлением правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., предъявляемым к кандидатским

диссертациям. Автор, Соколов Андрей Сергеевич, заслуживает присуждение учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «Молекулярная биология».

Отзыв на диссертацию А. С. Соколова был доложен, обсужден и одобрен 14.11.18. протокол №8, на заседании лаборатории «Молекулярных Механизмов Биологической Адаптации»

Заведующий лаборатории Молекул
доктор биологических наук, профес

ологической Адаптации

М. Б. Евгеньев

“15 ” ноября 2018 г.

*Подпись М.Б. Евгеньев удостоверяю
учёный секретарь ИЛБ РАН
Босаров А.А.*



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@eimb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

25.10.2018 № 12312-9311

На № 417/472 от 16.10.2018

В Диссертационный совет Д.217.013.01
НИЦ «Курчатовский институт-
ГосНИИГенетика»

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук сообщает о своём согласии выступить в качестве ведущей организации по диссертации Соколова Андрея Сергеевича «Хоминг-эндонуклеаза SegD бактериофага T4: биохимическая и функциональная характеристика», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Заместитель директора по научной работе
член-корреспондент РАН

В.Л. Карпов

СВЕДЕНИЯ**о ведущей организации**

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

Полное наименование организации	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук
Сокращенное наименование организации	ИМБ РАН
Организационно-правовая форма	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Ведомственная принадлежность	Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Почтовый индекс и адрес организации	ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32
Электронная почта организации	isinfo@eimb.ru
Официальный сайт организации	www.eimb.ru
Телефон организации	+7 (499) 135-23-11, +7 (499) 135-11-60
Факс организации	+7 (499) 135-14-05
Директор организации	Макаров Александр Александрович, д.б.н., профессор, академик РАН специальность 03.01.03 – «Молекулярная биология»

Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет

1. Golomidova A.K., Kulikov E.E., Kudryavtseva A.V., Letarov A.V., "Complete genome sequence of Escherichia coli bacteriophage PGT2" Genome Announc (2018), 6, 3, e01370-17, DOI: 10.1128/genomeA.01370-17
2. Korneev K.V., Kondakova A.N., Sviriaeva E.N., Mitkin N.A., Palmigiano A., Kruglov A.A., Telegin G.B., Drutskaya M.S., Sturiale L., Garozzo D., Nedospasov S.A., Knirel Y.A., Kuprash D.V. "Hypoacylated LPS from foodborne pathogen Campylobacter jejuni induces moderate TLR4-mediated inflammatory response in murine macrophages" Front Cell Infect Microbiol (2018), 8, FEB, 58, DOI: 10.3389/fcimb.2018.00058

3. Shulgin A., Spirin P., Lebedev T., Prokofjeva M., Stocking C., Prassolov V. "Targeted delivery of genes to plasmolipin-expressing cells using lentiviral particles pseudotyped with *Mus caroli* endogenous retrovirus envelope protein" *FEBS Open Bio* (2018), 8, , 338 – 338
4. Alexandrova L., Zicari S., Matyugina E., Khandazhinskaya A., Smirnova T., Andreevskaya S., Chernousova L., Vanpouille C., Kochetkov S., Margolis L., "Dual-targeted anti-TB/anti-HIV heterodimers" *Antivir Res* (2017), 145, , 175 - 183 DOI: 10.1016/j.antiviral.2017.07.011
5. Kravchenko D.S., Lezhnin Y.N., Hristichenko A.Y., Ivanova A.E., Chumakov S.P., "Lentiviral system for T-lymphocyte-based apoptin expression and internalization" *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* (2017), 9, 12, 2544 – 2548
6. Kretova, O.V., Chechetkin, V.R., Fedoseeva, D.M., Kravatsky, Y.V., Sosin, D.V., Alembekov, I.R., Gorbacheva, M.A., Gashnikova, N.M., Tchurikov, N.A. "Analysis of Variability in HIV-1 Subtype A Strains in Russia Suggests a Combination of Deep Sequencing and Multitarget RNA Interference for Silencing of the Virus" *Aids Res Hum Retrov* (2017), 33, 2, 194 - 201 DOI: 10.1089/aid.2016.0088
7. Lyupina YV, Dmitrieva SB, Timokhova AV, Beljelarskaya SN, Zatsepina OG, Evgen'ev MB, Mikhailov VS. An important role of the heat shock response in infected cells for replication of baculoviruses. *Virology*. 2010 Oct 25;406(2):336-41. doi: 10.1016/j.virol.2010.07.039. Epub 2010 Aug 13.
8. Pyatkov KI, Arkhipova IR, Malkova NV, Finnegan DJ, Evgen'ev MB. Reverse transcriptase and endonuclease activities encoded by Penelope-like retroelements. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 12;101(41):14719-24.

Ведущая организация подтверждает, что соискатель и его научный руководитель не являются ее сотрудниками, а также в ведущей организации не ведутся научно-исследовательские работы, по которым соискатель ученой степени является руководителем или работником организации-заказчика или исполнителем (соисполнителем).

Ученый секретарь ИМБ РАН
наук

ров Александр Анатольевич