

ЗАКЛЮЧЕНИЯ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 217.013.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ
ПРОМЫШЛЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ НАЦИОНАЛЬНОГО
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ» (НИЦ
«КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»-ГОСНИИГЕНЕТИКА) ПО ДИССЕРТАЦИИ НА
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

решение диссертационного совета от 18 декабря 2018 г. № 22
о присуждении Соколову Андрею Сергеевичу, гражданину Российской
Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Хоминг-эндонуклеаза SegD бактериофага T4: биохимическая и функциональная характеристика» по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология» принята к защите 9 октября 2018 г., протокол № 18а диссертационным советом Д 217.013.01, созданным на базе НИЦ «Курчатовский институт» - ГосНИИГенетика (117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1), утвержденного приказом РФ № 105/НК от 11 апреля 2012 г.

Соискатель Соколов Андрей Сергеевич, 1982 года рождения, в 2004 году окончил Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Удмуртский государственный университет», в 2006 году окончил магистратуру при Государственном образовательном учреждении высшего и профессионального образования «Пушкинский государственный университет». В 2009 году соискатель окончил аспирантуру при Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН по специальности «молекулярная биология». В настоящее время соискатель работает научным сотрудником в Лаборатории новых методов в Биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН, Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований» Российской академии наук»».

Диссертация выполнена в Лаборатории энзимологии генетических процессов Института биохимии и физиологии микроорганизмов имени Г. К. Скрыбина РАН.

Научный руководитель - кандидат биологических наук, Грановский Игорь Эдуардович, заведующий лабораторией энзимологии генетических процессов, ФГБУН «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН», г. Пущино.

Официальные оппоненты:

Прилипов Алексей Геннадьевич, доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной генетики, НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи»,

Ламан Александр Георгиевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии, филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчиникова РАН, дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, в своем **положительном** отзыве, подписанном доктором биологических наук, профессором, Евгеньевым М.Б., заведующим Лабораторией молекулярных механизмов биологической адаптации, в заключение к отзыву указала, что диссертационная работа Андрея Сергеевича Соколова «Хоминг-эндонуклеаза SegD бактериофага T4: биохимическая и функциональная характеристика», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является самостоятельным законченным научно-квалификационным исследованием по актуальной теме, результаты которой имеют существенное значение для современной генетики, биохимии и молекулярной биологии.

Однако отмечается наличие некоторых недостатков.

В экспериментах по анализу способности SegD инициировать генетическую рекомбинацию между T четными фагами не приведены данные, насколько 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. Высказаны замечания, относящиеся к оформлению работы: отсутствие перевода на русский язык некоторых величин, наличие опечаток, ошибок, жаргонных выражений, подписи к некоторым рисункам и таблицам представленные на следующем после них листе, несколько затрудняют восприятие материала. Однако указанные замечания не являются принципиальными. Представленная диссертационная работа по актуальности, научной новизне, фундаментальной и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов, соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученой степени», утвержденного постановлением правительства РФ №842 от 24.09.2013 г. редакции от 28.08.2017, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Соискатель имеет 8 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных изданиях.

Список научных работ по теме диссертации:

- 1) Sokolov A. S., Latypov O. R., Kolosov P. M., Shlyapnikov M. G., Bezlepkina T. A., Kholod N. S., Kadyrov F. A., Granovsky I. E. 2018. Phage T4 endonuclease SegD that is similar to group I intron endonucleases does not initiate homing of its own gene. *Virology*, 515, 215-222.
- 2) Соколов А. С., Грановский И. Г. 2014. Хоминг-эндонуклеаза SegD бактериофага T4: биохимические свойства. “Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю. А. Овчинникова”, Т.10, №3, стр. 5-11.
- 3) Brok-Volchanskaya V. S., Kadyrov F. A., Sivogrivov D. E., Kolosov P. M., Sokolov A. S., Shlyapnikov M. G., Kryukov V. M., Granovsky I. E. 2008. Phage T4 SegB protein is a homing endonuclease required for the preferred inheritance of T4 tRNA region occurring in co-infection with a related phage. *Nucleic Acids Res.*, 6, 2094-2105.

На диссертацию и автореферат поступили **положительные** отзывы:

от Розовой Ольги Николаевны, кандидата биологических наук, научного сотрудника Лаборатории радиоактивных изотопов, Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН.

от Штанчаева Рашида Шамильевича, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными интересами и достижениями в области генетики, микробиологии и молекулярной биологии микроорганизмов, позволяющими оценить научную и практическую значимость диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

Изучена новая сайт-специфическая эндонуклеаза бактериофага Т4. Полученные в настоящей работе данные о свойствах эндонуклеазы SegD дополняют информацию о хоминг-эндонуклеазах и, в частности, о ферментах, относящихся к GIY-YIG- семейству белков.

Показано, что ген *segD* помимо бактериофага Т4, обнаружен у фагов Т6, RB55 и RB59. Определена нуклеотидная последовательность области генов 23-24 фагов Т2L, Т6 и группы из 12-ти RB-фагов. Было показано, что у остальных фагов в данном локусе ген *segD* отсутствует.

Предложены подходы для проведения скрининга фагов с целью поиска гена *segD* у фагов родственных Т4.

Разработана методика получения белка SegD, создан штамм-продуцент, позволяющий нарабатывать достаточные количества белка.

Доказано, что SegD является Mg^{2+} -зависимой сайт-специфической эндодезоксирибонуклеазой. Данная эндонуклеаза способна гидролизовать природную ДНК Т-четных фагов, содержащую гликозилированные остатки гидроксиметилцитозина. Последовательность ДНК, узнаваемая и гидролизуемая эндонуклеазой SegD, обнаружена в геномах всех проанализированных фагов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

Показано, что SegD узнает протяженную ассиметричную последовательность ДНК длиной 16 п.н. и гидролизует её с образованием 3'-выступающих концов длиной три нуклеотидных остатка. Установлено, что природные модификации ДНК Т-четных бактериофагов не влияют на эффективность гидролиза эндонуклеазой SegD.

Раскрыты особенности процесса хоминга и показано, что для прохождения процесса хоминга гена *segD* необходимо наличие основного сайта гидролиза в реципиентом *segD*-бактериофаге. Показано, что для инициации данного процесса требуется повышенный, в сравнении с природным, уровень эндонуклеазы SegD в клетке.

Изучены физико-химические свойства SegD и определены оптимальные условия работы фермента.

Проведена модернизация модели функционирования генов хоминг-эндонуклеаз бактериофага Т4 и дополнена информация о белках Seg-группы, относящихся к малоизученному семейству GIY-YIG хоминг-эндонуклеаз.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем что:

Разработана и внедрена схема получения хоминг-эндонуклеазы SegD из штамма-продуцента на основе бактерий *Escherichia coli*.

Определены оптимальные условия работы фермента. Белок SegD обладает рядом уникальных свойств и может быть использован в качестве инструмента при манипуляции большими фрагментами ДНК как *in vitro* так и *in vivo*. Также данный белок может выступать в качестве основы для создания белков с заданной специфичностью.

Показано, что сайт эндонуклеазы SegD расположен на 3'-конце гена 23 на расстоянии 52 п.н. от сайта инсерции ОРС *segD*. У 29-ти Т4-родственных бактериофагов, проанализированных в данной работе, последовательность сайта узнавания оказалась идентична. Эта ситуация является крайне необычной, поскольку, как правило, предпочтительный сайт гидролиза хоминг-эндонуклеазы располагается в фаге, не содержащем ген хоминг-эндонуклеазы.

Продemonстрирована, способность хоминг-эндонуклеазы SegD выступать в роли инициатора генетической рекомбинации. Данная способность была исследована на модели, разработанной в ходе работы. Модель основана на гене *rIIB* бактериофага T4 и сайте гидролиза SegD, интегрированном в данный ген. Способность хоминг-эндонуклеазы SegD выступать в роли инициатора генетической рекомбинации может быть использована для создания на основе SegD систем сайт направленного мутагенеза и интеграции фрагментов ДНК в геномы различных организмов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

для экспериментальных работ, проведенных в данном исследовании, показана воспроизводимость результатов. Экспериментальные данные были получены на сертифицированном оборудовании. Теоретические положения и выводы, изложенные в диссертационной работе, базируются на современных литературных данных и экспериментальных результатах полученных автором. Анализ экспериментальных данных, полученных на достаточных объемах выборок, свидетельствует о высоком методическом уровне проведенной работы.

Личный вклад соискателя состоит в планировании исследований, выполнении основной экспериментальной работы, обработке, анализе данных и обсуждении полученных результатов. Автор также является основным участником написания статей по результатам данного исследования.

На заседании 18 декабря 2018 года диссертационный совет принял решение присудить Соколову А.С. ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 11 докторов наук по специальности 03.01.03 –молекулярная биология, участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 18, против - нет, недействительных – нет.

Председатель диссертационного совета
д.б.н., профессор, академик РАН

Дебабов В.Г.

Ученый секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент

Воюшина Т.Л.

Дата составления заключения

21 декабря 2018