

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки

**«Федеральный исследовательский центр
«Пушкинский научный центр биологических
исследований Российской академии наук»
(ФИЦ ПНЦБИ РАН)»**

142290, г. Пушкино Московской обл., проспект Науки, д.3.

Тел./факс: (4967)73-26-36, e-mail: info@pncbi.ru,

<https://www.pbcra.ru>

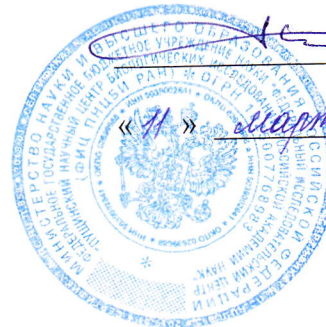
ОКПО 02699688, ОГРН 1025007768983,

ИНН/КПП 5039002841/503901001

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФИЦ ПНЦБИ РАН

д. ф.-м. н. П.Я. Грабарник



2024 г.

11.03.2024 № 191-01-2115/192

На № _____ от _____

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «ПУШКИНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ ПАУК»»**

Диссертация «Эволюционная дивергенция Т4-родственных бактериофагов, связанная с неканоническими азотистыми основаниями ДНК», представляемая Никулиным Никитой Алексеевичем на соискание ученой степен и кандидата биологических наук, выполнена в лаборатории молекулярной микробиологии Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН) – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН).

В 2019 г. соискатель Н.А. Никулин окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Вятский государственный университет» по специальности 06.04.01 «Биология». В 2023 году окончил очную аспирантуру ФИЦ ПНЦБИ РАН с присвоением квалификации «Исследователь. Преподаватель-исследователь» по направлению подготовки 06.06.01 «Биологические науки».

В период подготовки диссертации работал в должности младшего научного сотрудника в ИБФМ РАН (2019 – 2024 гг.) и в период с 2019 по 2023 гг. обучался в очной аспирантуре ФИЦ ПНЦБИ РАН.

В настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории молекулярной микробиологии ФИЦ ПНЦБИ РАН (ИБФМ РАН).

Справка о сдаче Н.А. Никулиным кандидатских экзаменов № 191-01-9211/647 выдана 17.10.2023 г. ФИЦ ПНЦБИ РАН.

Научный руководитель диссертационной работы – Зимин Андрей Антонович, к.б.н., в.н.с. лаборатории молекулярной микробиологии Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук».

Диссертационная работа Никулина Н. А. является научно-квалификационной работой, которая посвящена выделению и характеристике Т4-родственных бактериофагов с неканоническими азотистыми основаниями ДНК, а также выявлению роли неканонических оснований ДНК в эволюции Т4-родственных бактериофагов. По совокупности представленных результатов диссертационная работа может быть классифицирована как

существенное научное достижение в области молекулярной биологии и соответствует пп. 9 – 14 «Положения о порядке присуждении ученых степеней» ВАК РФ.

Актуальность темы диссертационной работы Никулина Н.А. обусловлена тем, что неканонические основания в составе ДНК бактериофагов могут представлять собой ранее существующее разнообразие оснований ДНК, которые были свойственны предкам бактерий, за счет особенной формы существования фагов, в результате чего изучение роли неканонических оснований в составе геномной ДНК бактериофагов может позволить выявить коэволюционные и эволюционные процессы, происходившие на ранних этапах формирования живых организмов. Кроме того, исследования Т4-родственных вирусов, актуальны как с точки зрения фундаментальных, так и прикладных знаний, в связи с возможностью использования их в изучении эволюции вирусов и коэволюции в системе «фаг-бактерия», а также изучении подбора наиболее перспективных агентов фаговой терапии, которая становится все более актуальна в связи с растущим числом бактерий с множественной устойчивостью к антибиотикам.

Научная новизна работы. Впервые проведено исследование фагового сообщества фекалий зубров Приокско-Террасного биосферного заповедника. Были найдены и охарактеризованы бактериофаги, принадлежащие к Т4-родственным. Определено наличие у них генетических маркеров, свойственных близкородственным *Tequatrovirus* Т4, определена их способность инфицировать штаммы *E.coli* с системами рестрикции-модификации.

Предложен новый метод скрининга, основанный на спот-тесте на штаммах с RM-системами, ПЦР и электрофорезе фаговых частиц для выделения фагов с неканоническими основаниями ДНК, принадлежащих к Т4-родственным бактериофагам. В результате из сточных вод очистных сооружений города Пущино были выделены Т4-родственные бактериофаги, которые имели неканонические основания в составе ДНК и принадлежали к родам *Tequatrovirus*, *Mosigvirus* подсемейства *Tevenvirinae*.

Впервые отмечено, что степень родства исследуемых вирусов зависит от наличия генов, способствующих воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК. Показано, что фаги, принадлежащие к одному роду, обладают одинаковыми неканоническими основаниями, схожими модификациями этих оснований и основными генами, способствующими воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК.

Впервые показано, что в процессе эволюции Т4-родственных бактериофагов происходило накопление генов, способствующих воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК, которые также участвуют в уменьшении возможностей взаимодействия их ДНК с ДНК бактерии-хозяина, что приводит к уменьшению возможностей горизонтального переноса генов хозяина.

Впервые определено общее расположение большинства генов синтеза 5-гидроксиметилцитозина и его модификаций у Т4-родственных вирусов в регионе между двумя коргенами – генами ДНК-полимеразы и хеликазы. Показано наличие внутри этого региона у представителей отдельных групп этих фагов разных хоминг-эндонуклеаз. Это, а также ряд других полученных данных может свидетельствовать о высокой частоте рекомбинации в данной области геномов у предков исследуемых бактериофагов.

На основе анализа геномов и информации из литературы и баз данных об источниках выделения представителей Т4-родственных вирусов, чьи полногеномные последовательности имелись в NCBI Nucleotide Collection, впервые показана связь эволюции Т4-родственных вирусов с экологическими нишами и генами, способствующими воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК.

На основе полученных результатов и эволюционной модели Постоянного Разнообразия (Constant-Diversity model) впервые предложена концепция эволюции предков Т4-родственных бактериофагов, которая базируется на влиянии неканонических оснований и генов, способствующих воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК.

Теоретическая и практическая значимость работы. Предложен подход выделения Т4-родственных бактериофагов из фекалий зубров и сточных вод и метод скрининга бактериофагов для определения принадлежности вирусов к Т4-родственным бактериофагам и наличия у них неканонических оснований ДНК.

Охарактеризовано 4 бактериофага, принадлежащие к родам *Tequatrovirus* и *Mosigvirus*. На основе их геномного анализа с родственными вирусами было найдено, что близкородственные Т4-родственные фаги обладают одинаковыми неканоническими основаниями в составе ДНК и генами, которые способствуют воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК.

Найдено, что фаги подсемейства *Tevenvirinae*, которые принадлежат к одному роду обладают схожими генами, способствующими воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК, и эти вирусы занимают схожие экологические ниши.

Определено общее расположение большинства генов синтеза 5-гидроксиметилцитозина и его модификаций у Т4-родственных вирусов в регионе между двумя коргенами – генами ДНК-полимеразы и хеликазы, и наличие в данном регионе разных хоминг-эндонуклеаз, что говорит о широких возможностях горизонтального переноса генов синтеза и модификаций 5-гидроксиметилцитозина у предков Т4-родственных вирусов.

Сформирована стратегия эволюции предков Т4-родственных бактериофагов, которая основана на влиянии экологических ниш и генов, способствующих воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК.

Полученные результаты позволяют сформировать новый подход к выбору агентов фаговой терапии. Кроме того, полученные результаты показывают, что влияние неканонических оснований на эволюцию вирусов может быть куда значительнее, чем гонка вооружений между бактериофагами и бактериями.

Методология и методы диссертационного исследования. Диссертационная работа выполнена с использованием современного оборудования, общенаучных и специальных методов исследования, включая методы микробиологии, молекулярной биологии, биоинформатики.

Степень достоверности результатов. Результаты работы получены при помощи современных методов и оборудования. Результаты являются достоверными и опираются на экспериментальные и литературные данные. Результаты, заключения и выводы отвечают целям и задачам диссертационной работы.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на конференциях: I международная (XIV региональная) научная конференция «Техногенные системы и экологический риск» (Обнинск, 2017 г.) (получен диплом II степени); Пущинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов» (Пущино, 2019 г., 2021 г., 2022 г.). Также результаты были представлены на конкурсе статей молодых ученых 2021 года МОО «Микробиологическое общество» (получен диплом II степени).

Часть работы выполнена при поддержке Российского научного фонда по приоритетному направлению деятельности Российского научного фонда «Проведение фундаментальных научных исследований и поисковых научных исследований малыми отдельными научными группами» по теме: «Трансдукция плазмид Т4-фагами в условиях, моделирующих природные».

Личный вклад автора. Личный вклад автора состоял в анализе литературных данных, выполнении и планировании основной части экспериментальной работы и анализе полученных данных, подготовке и публикации работ, представлении результатов на научных конференциях и конкурсах.

Публикации. Материалы диссертационной работы отражены в 12 публикациях, 6 статей из которых опубликованы в журналах, рекомендуемых ВАК Министерства

образования и науки РФ для защиты диссертаций, 5 из которых индексируются в библиографической базе Scopus, 2 из которых опубликованы в журналах квартиля Q1.

Статьи из изданий, входящих в список ВАК или приравненных им:

1. Конструирование терапевтических фаговых коктейлей на основе бактериофагов T4-типа: преимущества и недостатки / Н. А. Никулин, С. И. Кононенко, А. Г. Кошаев, А. А. Зимин // Политематический Сетевой Электронный Научный Журнал Кубанского Государственного Аграрного Университета. – 2017. – № 133. – С. 823-849
2. Zimin A. A. Homologs of the Bacteriophage T4 RNA Ligase 2 in Metagenomes of Ocean Microbiota / A. A. Zimin, N. A. Nikulin, N. N. Nazipova // Mathematical Biology and Bioinformatics. – 2020. – Vol. 15. – № S. – P. 88-108.
3. Nikulin N. A. Influence of Non-canonical DNA Bases on the Genomic Diversity of Tevenvirinae / N. A. Nikulin, A. A. Zimin // Frontiers in Microbiology. – 2021. – Vol. 12. – P. 632686.
4. Karmanova A. N. Structural organization, evolution, and distribution of viral pyrimidine dimer-DNA glycosylases / A. N. Karmanova, N. A. Nikulin, A. A. Zimin // Biophysical Reviews. – 2022. – Vol. 14. – № 4. – P. 923-932.
5. Phages for treatment of Escherichia coli infections / N. Nikulin, A. Nikulina, A. Zimin, R. Aminov // Progress in Molecular Biology and Translational Science. – 2023. – Vol. 200. – P. 171-206.
6. Comparative analysis of Actinobacteria phage-plasmids and their transduction potential / N. A. Nikulin, S. S. Kiselev, V. V. Panyukov [et al.] // Mathematical Biology and Bioinformatics. – 2023. – Vol. 18. – № 2. – P. 323-346.

Статья из издания, входящего в базу данных РИНЦ:

Никулин Н. А. Анализ Колифагов Зубров На Наличие Антирестрикционных Систем / Н. А. Никулин, М. Г. Шляпников, А. А. Зимин // Сборник Научных Трудов Краснодарского Научного Центра По Зоотехнии И Ветеринарии. – 2019. – Т. 8. – № 1. – С. 123-128

Публикации в материалах научных конференций:

1. Никулин Н. А. Бактериофаговая флора очистных сооружений города Пушкино Московской области / Н. А. Никулин, А. А. Зимин // в книге: Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов. Сборник тезисов III Пушкинской школы-конференции. Под редакцией Т.А. Решетиловой. 2016. С. 143-146.
2. Зимин А. А. Изучение бактериофаговой флоры европейских зубров *Bison bonasus* (L, 1758) и американских бизонов *Bison bison* (L, 1758) (Bovinae, Bovidae, Artiodactyla) Приокского-террасного государственного заповедника / А. А. Зимин, Н. А. Никулин, В. И. Землянко // в книге: Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов. Сборник тезисов III Пушкинской школы-конференции. Под редакцией Т.А. Решетиловой. 2016. С. 141-143.
3. Никулин Н. А. Биоиндикация загрязненности воды при помощи бляшкообразующих колифагов, инфицирующих штаммы *E.coli* C600, DH1, B, BL21 / Н. А. Никулин, А. А. Зимин // В книге: Техногенные системы и экологический риск. Тезисы докладов I международной (XIV региональной) научной конференции. Под общей редакцией А.А. Удаловой. 2017. С. 147.
4. Отбор и идентификация бактериофагов подсемейства Tevenvirinae с неканоническими основаниями ДНК из природных источников / Н. А. Никулин, Н. В. Воложанцев, А. А. Кисличкина [и др.] // В книге: VI Пушкинская школа-конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». Сборник тезисов конференции. Под редакцией Т.А. Решетиловой. Москва, 2019. С. 137-139.
5. Никулин Н. А. Особенности эволюции вирусов бактерий подсемейства Tevenvirinae / Н. А. Никулин, А. А. Зимин // В книге: VII Пушкинская конференция «Биохимия, физиология и биосферная роль микроорганизмов». Школа-конференция для молодых ученых, аспирантов и студентов «Генетические технологии в микробиологии и микробное

разнообразие». Сборник тезисов конференции. Под редакцией Т.А. Решетиловой. Москва, 2021. С. 68-70.

Диссертационная работа Никулина Н.А. соответствует п. 3. («Структура геномов, геномика, эпигеномика и транскриптомика. Биоинформатические методы анализа баз данных последовательностей ДНК, РНК и белков, в том числе при патологии у человека») и п. 12. («Молекулярная вирусология и противовирусные вещества» паспорта научной специальности 1.5.3. «Молекулярная биология».

Диссертация Никулина Н.А. «Эволюционная дивергенция T4-родственных бактериофагов, связанная с неканоническими азотистыми основаниями ДНК» соответствует требованиям, установленным пунктом 14 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (в ред. от 26.10.2023 г.) и рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. «Молекулярная биология».

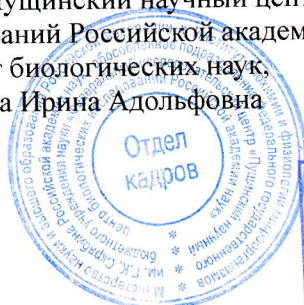
Диссертация и заключение рассмотрены на совместном семинаре лаборатории молекулярной микробиологии, лаборатории биологии плазмид и лаборатории энзимологии генетических процессов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук обособленного подразделения «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» от 28 ноября 2023 г. Присутствовало на заседании 28 чел. Результаты голосования: «ЗА» - 28 чел., «ПРОТИВ» - 0 чел., «ВОЗДЕРЖАЛОСЬ» - 0 чел., протокол № 9 от «28» ноября 2023 г.

Заключение принято на заседании Ученого совета Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук – обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук». Присутствовало на заседании 17 чел. из 26 членов Ученого совета. Результаты голосования: «ЗА» - 17 чел., «ПРОТИВ» - 0 чел., «ВОЗДЕРЖАЛОСЬ» - 0 чел., протокол № 2 от «05» марта 2024 г.

Главный научный сотрудник лаборатории физиологии микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук - обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»
доктор биологических наук, профессор
Вайнштейн Михаил Борисович



Ведущий научный сотрудник лаборатории биологии плазмид Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук - обособленного подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»
кандидат биологических наук,
Кошелева Ирина Адольфовна



Подпись Вайнштейна М.Б.
Кошелевой И.А.
УДОСТОВЕРЯЮ
Начальник отдела кадров ИБФМ РАН
5