

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Никулина Никиты Алексеевича «Эволюционная дивергенция Т4-родственных бактериофагов, связанная с неканоническими азотистыми основаниями ДНК», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология

Известно, что бактериофаги с двуцепочечной ДНК могут содержать большое количество неканонических азотистых оснований. Возможно, наличие таких оснований в ДНК бактериофагов связано с их защитой от бактериальных систем рестрикции-модификации, а также CRISPR/Cas. Другой причиной их существования может быть возможность сохранения ранее существующего разнообразия неканонических оснований у предков бактерий. Т4-родственные фаги представляют собой наиболее подходящие объекты для изучения влияния неканонических азотистых оснований на дивергенцию вирусов, поскольку их геномы достаточно представлены в базах данных. Кроме того, такие бактериофаги могут быть использованы в терапии бактериальных инфекций человека и животных. **Актуальность диссертационной работы** Н.А. Никулина несомненна, поскольку изучение роли неканонических азотистых оснований в ДНК бактериофагов поможет выявлению эволюционных и ко-эволюционных процессов, которые происходили на ранних стадиях формирования организмов.

### **Общая характеристика, структура и оформление диссертации.**

Диссертационная работа Н.А. Никулина написана и оформлена согласно требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям: она изложена на 172 страницах печатного текста, состоит из введения, обзора литературы, раздела, включающего описание материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, а также содержит 5 приложений. Список цитируемой литературы включает 186 наименований. Диссертация хорошо иллюстрирована, содержит 13 таблиц и 46 рисунков.

В разделе «**Введение**» Н.А. Никулин обосновал актуальность, научную новизну и практическую значимость данного исследования, четко сформулировал цели и задачи работы, описал методологию экспериментов и личный вклад в работу.

«**Обзор литературы**» имеет непосредственное отношение к теме диссертации, он посвящен современному состоянию исследований в области изучения Т4-родственных бактериофагов. Обзор литературы состоит из нескольких разделов. В начале обзора автором рассмотрена история открытия Т-четных фагов. Затем проанализировано изменение в классификации Т4-родственных бактериофагов. Подробно описана

таксономическая методология, применяемая в настоящее время в таксономии фагов, чему в немалой степени способствовало применение методов полногеномного секвенирования и биоинформатики. Отдельная глава «Обзора» посвящена исследованиям пангенома T4-родственных бактериофагов. В дальнейших главах рассмотрена структура неканонических азотистых оснований в ДНК бактериофагов, а также пути их биосинтеза. Автором отмечено большое разнообразие неканонических оснований и их модификаций у T4-родственных бактериофагов. Далее описаны белки, способствующие воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК. Н.А. Никулиным проанализированы основные эколого-эволюционные модели, использующиеся при рассмотрении коэволюции бактерий-хозяев и их бактериофагов. Показано, что одну из этих моделей - модель Постоянного Разнообразия (Constant Diversity), основанную на так называемой модели Убий Победителя (Kill-the-Winner), можно использовать при рассмотрении влияния неканонических оснований ДНК на эволюцию предков T4-родственных бактериофагов.

Таким образом, глава диссертации «Обзор литературы» демонстрирует, что T4-родственные бактериофаги можно использовать в качестве объектов для изучения влияния неканонических оснований в составе ДНК на геномное разнообразие и эволюцию вирусов. Обзор литературы убеждает в глубоком понимании Н.А. Никулиным как предыстории проблемы, так и современного ее состояния и подтверждает правомерность постановки задач и определения путей их решения. В целом обзор литературы является теоретическим обоснованием для выбора стратегии собственных исследований автора работы.

**«Материалы и методы»** изложены четко и подробно описаны. Автором использован широкий спектр современных методов микробиологии, молекулярной биологии, генетической инженерии, геномики и биоинформатики. Работа выполнена с использованием таких методов как ультрацентрифугирование фаговых частиц, ПЦР с вырожденными и специфическими праймерами, гель-электрофорез фаговых частиц и ампликонов в агарозе, спот-тест на ограничение роста бактериофагов на штаммах *E. coli* с системами рестрикции-модификации II типа, секвенирование геномной ДНК фагов. Эти методы применены для сравнительного анализа геномов бактериофагов и пангеномного анализа групп бактериофагов. Применение разных подходов, несомненно, делает результаты работы надежными и достоверными. Основные научные положения диссертации и выводы обоснованы и логично вытекают из полученных экспериментальных данных.

Глава **«Результаты и обсуждение»** диссертации Н.А. Никулина состоит из нескольких частей. Вначале автором были выделены бактериофаги из двух источников – сточных вод очистных сооружений г. Пущино и из фекалий зубров Приокско-Тerrasного



заповедника. В пробах из сточных вод обнаружены бактериофаги, образующие негативные колонии на штамме *E. coli* В. Поскольку преобладали бляшки относительно малого размера, автором сделан вывод, что это свойственно Т4-родственным бактериофагам, обладающим белками R, за счет чего ингибируется лизис бактерий. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии охарактеризованы бактериофаги из фекалий зубров, способные инфицировать штамм *E. coli* В. Показано, что в основном выделены хвостатые фаги.

Далее с помощью так называемого спот-теста Н.А. Никулиным проведен скрининг бактериофагов рабочей коллекции на принадлежность к Т4-родственным бактериофагам, а также наличие у них антирестрикционных систем. С этой целью фаги высевали на чашки Петри с различными штаммами бактерий, характеризующимися наличием или отсутствием систем рестрикции-модификации (RM). Показано, что рост большинства фагов, выделенных автором (58 из 62), не ограничивался на штаммах *E. coli*, обладающих RM-системами. Проведен ПЦР-анализ коллекции фагов как с вырожденными праймерами, специфическими для генов главного белка капсида Т4-родственных фагов, так и с праймерами к последовательности ДНК вида *Tequatrovirus* Т4. В результате автором показано, что в составе геномной ДНК большинства выделенных фагов (58 из 62) присутствовала последовательность гена главного белка капсида, свойственного Т4-родственным бактериофагам. Кроме того, у 51 бактериофага в составе геномной ДНК обнаружена консервативная последовательность, свойственная фагам, близкородственным виду *Tequatrovirus* Т4. В дальнейших экспериментах Н.А. Никулин выбрал метод электрофореза фаговых частиц для дифференциации некоторых выделенных им Т4-родственных бактериофагов. Этот метод позволил отличить по электрофоретической подвижности бактериофаги, относящиеся к разным родам, что подтверждено после секвенирования их геномов. Определены нуклеотидные последовательности четырех фагов и построены карты аннотированных геномов. Найдены гены синтеза неканонических оснований. Показано, что выделенные Т4-родственные бактериофаги принадлежали к родам *Mosigvirus* и *Tequatrovirus*.

Автором отмечено, что набор генов, участвующих в синтезе и модификации неканонических оснований отличался в зависимости от рода фагов. В связи с этим Н.А. Никулиным было проведено детальное исследование геномов Т4-родственных бактериофагов из базы данных NCBI Nucleotide Collection для выявления особенностей наследования генов, способствующих воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК, а также для прояснения вопроса, каким образом данные гены повлияли на эволюцию анализируемой группы вирусов. Для анализа использовались последовательности 199 геномов. Н.А. Никулиным построены филогенетическое дерево

гомологов главного белка капсида, пангеномное и филогеномное деревья, двудольная сеть оболочки пангенома для выявления эволюционных взаимосвязей бактериофагов подсемейства *Tevenvirinae*. Аминокислотная последовательность главного белка головки вирусов с двуцепочечной ДНК является одной из наиболее консервативных вирусных последовательностей. Ген данного белка менее других генов вирусов подвержен горизонтальному переносу генов. Следовательно, филогенетическое дерево на основе последовательностей главного белка головки позволяет наиболее точно отразить вертикальный перенос генов между родственными вирусами. Филогеномное дерево отражает генетическое разнообразие наиболее близких по родству вирусов, за счет использования полной нуклеотидной последовательности геномов. Пангеномное дерево позволяет лучше отразить генетическое разнообразие более удаленных по родству вирусов, что связано с использованием всех аминокислотных последовательностей вирусов. Двудольная сеть позволяет лучше, чем деревья отразить горизонтальный обмен между вирусами. При использовании только гомологичных кластеров оболочки пангенома двудольная сеть позволяет лучше отразить экологические взаимосвязи вирусов.

Н.А. Никулиным показано, что бактериофаги внутри одного рода имеют схожий набор генов, способствующих воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК, одинаковые неканонические основания и схожие модификации таких оснований. В то же время между родами такие гены отличаются. Автором определены особенности наследования таких генов, возможное влияние на эволюцию T4-родственных бактериофагов. Н.А. Никулиным определено общее расположение большинства генов синтеза 5-гидроксиметилцитозина между генами ДНК-полимеразы и хеликазы. Внутри данного участка ДНК показано наличие разных хоминг-эндонуклеаз. Этот факт может говорить о высокой частоте рекомбинации в данной области генома. Автором предложена стратегия эволюции предков T4-родственных бактериофагов, основанная на меж- и внутри-нишевых отличиях в способностях горизонтального обмена информации между T4-родственными бактериофагами и окружающей средой. Такая стратегия может быть описана представленной в «Обзоре литературы» эколого-эволюционной моделью Постоянного Разнообразия (Constant Diversity Model). Данная модель с точки зрения предложенной стратегии эволюции подразумевает наличие генов, способствующих воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК, так как подобные гены позволяли по-разному взаимодействовать с бактериями и другими вирусами предкам T4-родственных фагов. Автором проверена возможность распространения данной модели на другие группы вирусов при помощи пангеномного анализа геномов вирусов этих групп. Показано, что гены синтеза и модификации неканонических оснований у ряда групп вирусов



располагаются в схожей с Т4-родственными фагами области, так у вирусов хлорелл рода *Chlorovirus* имеются гомологи генов Т4-родственных бактериофагов, способствующие воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК. Полученные Н.А. Никулиным данные могут быть использованы для выбора генетических маркеров, позволяющих отбирать Т4-родственные бактериофаги определенного рода. Кроме того, полученные результаты могут помочь в отборе фагов с необходимой исследователю частотой трансдукции.

Таким образом, Н.А. Никулиным показано, что неканонические основания сыграли одну из важнейших ролей в эволюции Т4-родственных бактериофагов и их дивергенции. В дальнейшем возможно использование таких бактериофагов в качестве модели для исследования различных аспектов роли неканонических оснований в составе ДНК.

**Новизна, актуальность и практическая значимость данного диссертационного исследования не вызывают сомнения**, поскольку Н.А. Никулиным впервые проведены исследования фагов, выделенных из фекалий зубров Приокско-Тerrasного заповедника, и охарактеризованы бактериофаги с антирестрикционными системами из сточных вод очистных сооружений г. Пушкино. Автором предложен новый метод скрининга бактериофагов с неканоническими основаниями ДНК. Н.А. Никулиным впервые показано, что в процессе эволюции Т4-родственных бактериофагов происходило накопление генов, способствующих воспроизведению фагов с модифицированными основаниями в составе ДНК. Автором сформулирована стратегия эволюции предков Т4-родственных бактериофагов, основанная на влиянии экологических ниш и генов, отвечающих за синтез неканонических оснований. Результаты, полученные Н.А. Никулиным, имеют практическое значение, поскольку позволяют разработать новые подходы к выбору бактериофагов, используемых в терапии заболеваний человека и животных.

#### **Замечания и вопросы.**

Следует отметить, что диссертация хорошо оформлена, имеет большое количество иллюстративного материала, написана четким, понятным языком. **Замечаний по диссертации практически нет.** Есть небольшое количество опечаток, погрешности в стиле изложения, некоторые сокращения отсутствуют в «Списке сокращений» (например, Cas, БОЕ, МОИ, INTV, ТЭМ, ГСК), а некоторые общеизвестные аббревиатуры можно исключить из списка (ДНК, РНК). Модифицированные основания часто сокращаются в тексте, но их нет в «Списке сокращений». В «Списке сокращений» есть сокращения п.о. и т.п.о. (пары оснований, тысячи пар оснований), а в тексте появляются kb, п.н. и т.п.н. Между подписями к рисункам и текстом надо было сделать пробел. В списке литературы следовало

бы использовать общеупотребимые сокращения названий журналов. Латинские названия организмов и эндонуклеаз рестрикции не везде написаны курсивом. Неплохо было бы ввести дополнительную нумерацию подзаголовков в разделах «Обзор литературы» и «Результаты и обсуждение», а не выделять жирным шрифтом, это облегчило бы поиск нужных разделов в «Оглавлении». Про источники бактериофагов, используемых в работе, надо было написать не только в главах «Введение» и «Результаты», но и прежде всего в «Методах». Фотографии спот-тестов (рисунки 28-30) можно было немного отредактировать. В подписи к рисунку 31, на котором представлена электрофореграмма фаговых частиц, надо было расшифровать, что означают целевые полосы (а не только в тексте после рисунка). Однако, эти замечания носят рекомендательный характер и не умаляют значения полученных результатов.

При прочтении работы возникли **вопросы**, ответы на которые хотелось бы услышать от автора.

1. В диссертации часто используется термин «коргены» (от английского «core genes»). Имеются ли публикации на русском языке, где используется такой термин? Обычно гены коргенома в российских статьях называют универсальными или базовыми (коровыми) генами. Возможно, надо было привести использованный Вами термин в «Списке сокращений».
2. В разделе 3.1.1. «Результатов» приведены данные электронной микроскопии (ТЭМ) одного из образцов бактериофагов из фекалий зубров. Автор сделал вывод, что в анализируемых препаратах нет Т4-родственных фагов, а преобладают другие хвостатые фаги. В дальнейшем же с помощью других методов в образцах, выделенных из фекалий зубров, были обнаружены Т4-родственных фаги. Наверное, это обстоятельство надо было прояснить сразу при обсуждении результатов ТЭМ. Кроме того, почему образцы из сточных вод не были проанализированы с помощью ТЭМ?
3. В работе сделано определение нуклеотидных последовательностей геномов нескольких бактериофагов, выделенных из сточных вод. По какой причине не выбраны фаги из фекалий зубров?
4. Известно, что препараты на основе бактериофагов можно использовать в терапии некоторых заболеваний человека и животных. Планируете ли Вы в дальнейшей работе применить выделенные Вами бактериофаги для создания таких препаратов? Какие исследования необходимы для этого?



**Заключение.** В целом, диссертационная работа Н.А. Никулина отличается новизной и научной значимостью полученных данных. Выводы подтверждены большим количеством экспериментов и их достоверность не вызывает сомнений. Материалы диссертации опубликованы в международных и российских журналах из списка ВАК РФ и доложены на нескольких конференциях. Автореферат полностью и адекватно отражает содержание диссертации.

Таким образом, диссертационная работа Никулина Никиты Алексеевича «Эволюционная дивергенция T4-родственных бактериофагов, связанная с неканоническими азотистыми основаниями ДНК» является законченной научно-квалификационной работой, имеющей большое научное и практическое значение для современной молекулярной биологии. По актуальности темы, новизне, теоретической и практической значимости результатов работа соответствует критериям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, в том числе пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от № 842 от 24.09.2013 г. (с изменениями Постановлений Правительства РФ № 335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016 г., № 650 от 29.05.2017 г., № 426 от 20.03.2021 г.), а ее автор, Никита Алексеевич Никулин, несомненно заслуживает присуждения искомой степени по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Старший научный сотрудник  
Группы биотехнологии растений  
Филиала Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки Института  
биоорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
142290 г. Пущино Московской обл.,  
Проспект Науки, д. 6  
доктор биологических наук  
(03.00.03 – молекулярная биология)  
E-mail: ruk@bibch.ru Тел. 8-4967-33-09-70

24 апреля 2024 г.

Подпись заверяю

СПЕЦИАЛИСТ ОТДЕЛА  
КАДРОВ  
Лизгунов А.И.



Рукавцова Елена Борисовна