

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального бюджетного учреждения науки
“Московский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского”
Федеральной службы по надзору в сфере защиты
прав потребителей и благополучия человека,
д.б.н. С.Ю. Комбарова



2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального бюджетного учреждения науки “Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского” Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о научно-практической ценности диссертационной работы Никулина Никиты Алексеевича «Эволюционная дивергенция Т4-родственных бактериофагов, связанная с неканоническими азотистыми основаниями ДНК», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Актуальность темы диссертационной работы

Т4-родственные бактериофаги представляют собой группу вирусов, которые широко используются в фундаментальных и прикладных исследованиях различных областей биологии. Наиболее изученными представителями данных фагов являются Т2, Т4, Т6 – классические объекты молекулярной биологии, сыгравшие одну из ключевых ролей в становлении данной области биологии. До сих пор ферменты фага Т4 используются как инструменты генной инженерии и молекулярной биологии. В работе Никулина Никиты Алексеевича рассматривается влияние неканонических азотистых оснований ДНК на эволюцию Т4-родственных бактериофагов. Неканонические азотистые основания представляют особый интерес в сфере исследований эволюции вирусов бактерий, в связи с тем, что у фагов было найдено наибольшее разнообразие таких оснований среди всех известных биологических объектов. Изучение влияния на биоразнообразие Т4-родственных бактериофагов этих оснований может позволить понять причину этого явления. Учитывая современную проблему множественной устойчивости патогенных бактерий к антибиотикам, все более актуальными становятся альтернативные подходы к терапии инфекционных заболеваний,

например, фаговая терапия. Т4-родственные вирусы инфицируют многие патогенные бактерии и известны многие детали молекулярных механизмов их жизнедеятельности, за счет чего их широко используют в процессах разработки фаговых коктейлей. Однако, есть необходимость в тщательном отборе безопасных агентов для фаговой терапии. Особое внимание следует уделять к способности фагов к горизонтальному переносу генов – выбранный агент не должен иметь возможности трансдукции. В данной работе проводился анализ геномов Т4-родственных бактериофагов на наличие гомологов генов, снижающих частоту трансдукции, что может быть использовано в целях отбора нетрансдуцирующих бактериофагов. Таким образом, исследование Никулина Н. А., которое посвящено роли неканонических азотистых оснований в эволюции Т4-родственных вирусов, является актуальным как с точки зрения фундаментальных, так и прикладных наук.

Новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В работе Никулиным Н. А. впервые было продемонстрировано биоразнообразие фагов, инфицирующих *E. coli* желудочно-кишечного тракта зубров Приокско-Тerrasного биосферного заповедника, что может быть использовано в целях подбора фагов для терапии этих животных при возникновении у них дисбиозов.

Впервые был предложен метод отбора Т4-родственных бактериофагов с неканоническими основаниями, основанный на спот-тесте на штаммах с системами рестрикции-модификации, ПЦР и электрофорезе фаговых частиц. Данный подход в дальнейшем может быть использован для отбора фагов в целях фаговой терапии.

Впервые путем анализа геномов Т4-родственных бактериофагов в работе были показаны особенности расположения генов синтеза и модификации 5-гидроксиметилцитозина и наличия схожих особенностей расположения генов синтеза и модификации других неканонических пиримидинов, что является важным открытием с точки зрения изучения эволюции вирусов.

На основе анализа геномов фагов впервые показано влияние неканонических оснований и ассоциированных с ними генов на родство вирусов и накопление в процессе эволюции у Т4-родственных бактериофагов гомологов генов, которые участвуют в уменьшении возможности горизонтального переноса генов бактерий-хозяев.

Впервые отмечено совокупное влияние экологических ниш и неканонических оснований на геномное разнообразие Т4-родственных

вирусов. Данные открытия, несомненно, имеют важное значение для понимания возможных путей эволюции вирусов в целом. Полученные данные имеют и прикладное значение, на их основе возможно создание методов отбора бактериофагов для нужд биотехнологии, молекулярной генетики, фаговой терапии.

Кроме того, впервые предложена стратегия эволюции T4-родственных бактериофагов, основанная на влиянии экологических ниш и неканонических оснований с ассоциированными с ними генами. Данная стратегия может быть использована для объяснения широкого распространения этих вирусов в различных экологических нишах, а также может быть использована для исследования вирусов, имеющих неканонические основания, других таксономических групп.

Связь новизны исследований с планами соответствующих отраслей науки

Часть работы выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-25-00669 "Трансдукция плазмид T4-фагами в условиях, моделирующих природные" (рег. № 122031600276-6).

Значимость для науки и практики результатов, полученных автором в диссертационной работе

Полученные результаты позволяют сформировать новый подход к выбору агентов фаговой терапии, на основе данных о генах, способствующих воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК. Кроме того, полученные результаты показывают, что влияние неканонических оснований на эволюцию вирусов может быть куда значительнее, чем коэволюционные. Полученные Никулиным Н.А. результаты могут быть использованы для таксономического определения родов T4-родственных вирусов. Кроме того, они могут быть использованы для определения бактериофагов, которые не способны к трансдукции, с целью отбора перспективных агентов фаговой терапии. Полученные данные по расположению и наследованию генов синтеза и модификации неканонических оснований, данных о влиянии неканонических оснований на эволюцию T4-родственных бактериофагов, несомненно, полезны для дальнейших исследований эволюции вирусов, создания методов отбора бактериофагов для целей таких областей биологии как молекулярная биология, биотехнология.

Достоверность и апробация результатов исследования, в том числе публикации в рецензируемых изданиях

Диссертационная работа Никулина Н. А. характеризуется обоснованной постановкой цели и задач исследования, которые подтверждаются большим объемом экспериментальных исследований. Результаты работы были

получены с использованием классических и современных методов микробиологии, молекулярной биологии, биоинформатики. Достоверность результатов также подтверждается использованием современного оборудования, необходимого количества повторов экспериментов. Для обработки результатов использовались общепринятые статистические методы. Сформулированные в работе научные положения, выводы и заключения основаны на полученных экспериментальных данных и соответствуют цели и задачам исследования. 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. 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).

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты исследования имеют большое фундаментальное значение в области исследования бактериофагов. Данные по особенностям наследования генов, способствующих воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК, возможному изменению частоты трансдукции, связанному с ними, открывают перспективы для новых направлений фундаментальных и прикладных исследований, в частности для подходов отбора бактериофагов в целях фаговой терапии. Результаты исследования могут быть использованы при создании лекций по бактериофагам для студентов-биологов высших учебных заведений.

Соответствие специальности

Тема диссертации, цель и задачи, основные положения и выводы полностью соответствуют специальности 1.5.3. Молекулярная микробиология.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертационная работа Никулина Никиты Алексеевича построена по традиционному принципу и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения,

заключения, выводов, списка литературы, пяти приложений. Работа изложена на 172 страницах, включает 46 рисунков, 13 таблиц. Список литературы включает 186 источников.

В разделе «Введение» сформулированы актуальность темы, цели и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, теоретическая и практическая значимость, новизна работы, дана общая характеристика методологии, представлены сведения о степени достоверности и апробации результатов, личном вкладе автора.

В разделе «Обзор литературы» подробно изложены история исследования Т4-родственных бактериофагов, изменение классификации Т4-родственных бактериофагов и подходов к их классификации, представлены известные неканонические основания и пути их биосинтеза, изложены исследования пан-генома Т4-родственных бактериофагов, эколого-эволюционные модели, используемые для бактериофагов. Отдельное внимание уделено генам, способствующим воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК, найденным у Т4-родственных бактериофагов.

В разделе «Материалы и методы» представлены использованные в работе реактивы, штаммы бактерий и бактериофагов, подробно изложены как классические, так и современные методы микробиологии, молекулярной биологии, биоинформатики, использованные в работе: выделение и очистка бактериофагов из проб, трансмиссионная микроскопия фаговых частиц, полимеразная цепная реакция, электрофорез в агарозном геле, спот-тест, секвенирование, сборка и аннотация геномов, методы сравнительного геномного анализа. В работе описаны следующие методы сравнительного геномного анализа, использованные в работе: кластеризация гомологичных последовательностей из аннотаций геномов, пангеномный анализ, построение филогенетических, филогеномных, пангеномных деревьев, двудольных сетей.

В разделе «Результаты исследований и их обсуждение» представлен отбор бактериофагов из фекалий зубров и сточных вод очистных сооружений, а также характеристика этих вирусов. Проведено определение наличия у выделенных бактериофагов систем антирестрикции, принадлежности вирусов к Т4-родственным бактериофагам, различий в электрофоретической подвижности частиц. На основе анализа геномов отобранных Т4-родственных бактериофагов с неканоническими основаниями найдена корреляция между родством Т4-родственных бактериофагов и наличия разных генов синтеза и модификаций неканонических оснований. Показаны путем сравнительного геномного анализа, филогенетических, филогеномных, пангеномных, сетевых анализов геномов фагов *Tevenvirinae* из баз данных, особенности

наследования генов, способствующих воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК, возможное влияние этих генов на эволюцию Т4-родственных бактериофагов, влияние экологических ниш на эволюцию Т4-родственных фагов. Сформулирована концепция эволюции Т4-родственных бактериофагов, связанная с неканоническими основаниями и экологическими нишами. Рассмотрена возможность распространения полученных результатов на другие группы вирусов и возможность использования полученных результатов для отбора из Т4-родственных вирусов наиболее перспективных агентов фаговой терапии.

В заключении Никулиным Н. А. приводится обобщение результатов проведенной работы, подводятся их итог. Выводы логически следуют из полученных результатов и соответствуют целям и задачам исследования.

Содержание автореферата полностью соответствует содержанию диссертации.

Принципиальных замечаний к представленной научной работе нет. Имеются незначительные замечания:

1. Наименование штаммов *E. coli* и других видов бактерий, используемых в работе, не содержат номеров коллекционного депонирования (в главе 2.1.5).

2. Требуется уточнение словосочетания «фаговый раствор» с точки зрения отсутствия в данном буферном растворе фаговых частиц (в 2.1.4).

В диссертации присутствуют некоторые пунктуационные ошибки и опечатки: на странице 8 в задаче №1 нет запятой при перечислении источников; на странице 9 в задаче №2 – лишняя запятая; на странице 22 – подряд написано слово «семейств»; нет запятой на 46 странице в п. 1.3.3; на странице 69 во 2 абзаце логичнее после слова «...следующее..» поставить двоеточие и продолжить предложение; в п. 3.1.2 в подзаголовке не поставлено тире в слове спот-тест; на странице 84 пропущено слово в 3-ем абзаце; стр.82 во 2-ом абзаце не хватает двоеточия; стр.124 – два раза подряд написано слово «что что»

Все вышеизложенные замечания ни в коей мере не снижают достоверность полученных результатов и их высокий научный уровень.

Заключение

Диссертационная работа Никулина Никиты Алексеевича на тему «Эволюционная дивергенция Т4-родственных бактериофагов, связанная с неканоническими азотистыми основаниями ДНК», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности


1.5.3. Молекулярная биология, выполненная под руководством кандидата биологических наук Зимина Андрея Антоновича, является самостоятельным, законченным научным исследованием и соответствует требованиям и критериям пунктов 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (с изменениями в редакции Постановлений Правительства РФ от 30.07.2014 №723, от 21.04.2016 №35, от 02.08.2016 №748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 №024, от 01.10.2018 №1168, от 26.05.2020 №751, от 20.03.2021 №426, от 11.09.2021 №1539, от 26.09.2022 №1690, от 26.01.2023 №101, от 18.03.2023 №415, от 26.10.2023 №1786), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор, Никулин Никита Алексеевич, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Отзыв заслушан, обсужден и одобрен на заседании Ученого совета ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора (протокол № 5 от «25» апреля 2024 г.).

Отзыв составил:

Заместитель директора по медицинской биотехнологии Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (г. Москва, 125212, улица адмирала Макарова, д. 10., +7 (495) 452-18-16, andreialeshkin@googlemail.com)
профессор РАН, член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук

Алешкин Андрей Владимирович

25.04.2024 

Подпись Алешкина Андрея Владимировича заверяю:

Учёный секретарь Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (г. Москва, 125212, улица адмирала Макарова, д. 10., +7 (495) 452-18-16, Факс (495) 452-1830, info@gabrich.com)
кандидат медицинских наук

Сафронова Алла Васильевна

25.04.2024 