

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.

Неканонические основания ДНК – это основания, отличные от гуанина, цитозина, аденина и тимина. По имеющимся данным, они наиболее распространены среди вирусов бактерий. Подробно были охарактеризованы неканонические основания, встречающиеся в вирусной ДНК группе, объединенные в Т4-родственные бактериофаги. На сегодняшний день нет единого мнения о том, почему бактериофаги имеют большое число различных оснований в составе ДНК. Так, например, у Т4 бактериофага цитозин полностью заменен на 5-гидроксиметилцитозин; он же, в свою очередь, в составе ДНК дополнительно модифицируется – глюкозилируется. Считается, что за счет ДНК с неканоническими основаниями осуществляется защита генома фага от систем рестрикции-модификации и CRISPR-Cas систем бактерий-хозяев. Тем не менее, остаются открытыми вопросы: в какой момент в коэволюционной гонке между фагами и бактериями произошло появление в геноме фагов неканонических оснований, и являются ли вирусы с неканоническими основаниями носителями той формы нуклеиновых кислот, которая могла существовать на ранних этапах формирования живых организмов.

Все эти актуальные для области эволюции вопросы подробно рассмотрены в диссертационной работе Никулина Н.А. «Эволюционная дивергенция Т4-родственных бактериофагов, связанная с неканоническими азотистыми основаниями ДНК». Помимо этого, бактериофаги являются перспективными объектами для биотехнологии и фармакологии, поскольку их можно рассматривать в качестве агентов фаговой терапии и как источник получения генов ферментов, в том числе для работы с неканоническими основаниями.

В работе Никулина Н.А. бактериофаги с неканоническими основаниями предлагаются в качестве инструмента для альтернативной терапии бактериальных инфекций животных и человека. Также Никулиным Н.А. были выделены несколько новых Т4-родственных бактериофагов, которые могут быть в дальнейшем использованы при лечении колибактериозов животных. Таким образом, исследование Никулина Н.А. безусловно является актуальным как с точки зрения исследований эволюционных процессов, так и имеет практическую значимость для медицины и ветеринарии.

Диссертационная работа Никулина Н.А. построена по стандартной схеме и содержит разделы: «введение», «обзор литературы», «материалы и методы», «результаты исследований и их обсуждение», «закключение», «выводы», «список сокращений», «список литературы» и «приложения». Работа представлена на 172 страницах машинописного текста, содержит 46 рисунков, 13 таблиц, список цитируемой литературы включает 186 источников.

Основной целью диссертационного исследования Никулина Н.А. является определение влияния неканонических оснований ДНК на эволюцию Т4-родственных бактериофагов. Для достижения этой цели Никулиным Н.А. были сформулированы четыре масштабные задачи, которые были успешно решены в ходе работы. Помимо целей и задач, в разделе «Введение» были приведены обоснования актуальности, научной новизны, практической значимости исследования.

Раздел «Обзор литературы» хорошо сформирован, охватывает разные аспекты исследования в области Т4-родственных бактериофагов: историю открытия, современную таксономию этих бактериофагов, пан-геномные исследования Т4-родственных фагов, эколого-эволюционные модели коэволюции фагов и их бактерий-хозяев, описания структур неканонических оснований ДНК фагов и пути их биосинтеза. Пристальное внимание Никулин Н.А. уделяет белкам, которые не только прямо, как например тимидилатсинтаза, но и косвенно, участвуют в метаболизме и синтезе неканонических оснований, например эндонуклеазы, кодируемые фагом и продукты генов, ингибирующих системы рестрикции-модификации IV типа бактерий-хозяев. Никулин Н.А. привел подробное описание действия данных белков, их генов и объединил их под названием «белки, способствующие воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК». Разрабатывая алгоритм собственных исследований, Никулин Н.А. при формировании «рабочей» коллекции фагов с неканоническими основаниями, а также осуществляя биоинформатический анализ Т4-родственных фагов, опирается именно на данные гены. Таким образом, обзор литературы полностью выполняет свою функцию и является отличным введением для понимания всех аспектов исследования, проведенного соискателем, что отражает высокий уровень его компетенции в тематике исследования.

Автор при выполнении диссертационной работы использовал значительное количество методов из областей современной микробиологии, молекулярной биологии, биоинформатики и эволюционной биологии. В частности, Никулиным Н.А. для выделения фагов с неканоническими основаниями ДНК из фекалий зубров и сточных вод были использованы следующие методы: очистка фаговых частиц путем их ультрацентрифугирования в градиенте цезия, спот-тест на ограничение роста бактериофагов на штаммах *E. coli* с системами рестрикции-модификации II типа, ПЦР с вырожденными и специфическими праймерами, гель-электрофорез фаговых частиц и ампликонов в агарозе и секвенирование геномной ДНК фагов. Стоит отметить, что совокупность подобранных Никулиным Н.А. методов может, в перспективе, использоваться в качестве некоторого протокола или инструкции для выделения Т4-родственных фагов с неканоническими основаниями из природных источников. Для решения задач, касающихся формирования концепции влияния неканонических оснований ДНК на эволюцию Т4-родственных фагов использованы методы сравнительного геномного анализа, такие как: кластеризация гомологичных последовательностей из аннотаций геномов, пангеномный анализ, построение филогенетических, филогеномных и пангеномных деревьев, двудольных сетей. Описание

всех перечисленных методов достаточно подробно для их воспроизведения и полностью соответствует экспериментальной работе, выполненной автором диссертации.

Раздел «Результаты исследований и их обсуждение» представляет данные, подтверждающие положения диссертации, выносимые на защиту автором. Часть главы содержит результаты получения Т4-родственных бактериофагов с неканоническими основаниями, не относящихся к близкородственным фагам Tequatrovirus T4. Никулиным Н.А. было выделено и очищено 62 бактериофага из сточных вод и фекалий зубров, путем скрининга спот-тестом на ограничение роста штаммов фагов на *E.coli* с системами рестрикции-модификации II типа, ПЦР-тестов с вырожденными праймерами было отобрано 58 изолятов фага, которые являлись Т4-родственными фагами и имели антирестрикционные системы. Из них только 7 не являлись представителями вида Tequatrovirus T4. Далее из них на основе электрофореза частиц Никулину Н.А. удалось разделить фаги на 3 группы в зависимости от подвижности частиц, на основе этого были отобраны 4 фага для их дальнейшего анализа. Их секвенирование и дальнейший анализ подтвердили, что данные фаги имели гены синтеза и метаболизма неканонических оснований, в частности гены синтеза 5-гидроксиметилцитозина и гены его модификаций. Фаги относились к родам Mosigvirus и Tequatrovirus.

На основе анализа геномов отобранных Т4-родственных бактериофагов с неканоническими основаниями была найдена корреляция между родством Т4-родственных бактериофагов и наличием разных генов синтеза и модификаций неканонических оснований. В частности, было показано, что набор генов, способствующих воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК, отличается на уровне рода среди Т4-родственных фагов. На основе этих экспериментальных данных, Никулин Н.А. провел анализ геномов Т4-родственных фагов, представленных в базе данных NCBI Nucleotide Collection для определения влияния экологических факторов и генов, способствующих воспроизведению фагов с неканоническими основаниями на дивергенцию Т4-родственных фагов в процессе их эволюции. Далее путем сравнительного геномного анализа, филогенетических, филогеномных, пангеномных, сетевых анализов геномов фагов Никулин Н.А. показал особенности наследования генов, способствующих воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК, отметил возможное влияние этих генов и экологических ниш на эволюцию Т4-родственных бактериофагов.

Никулин Н.А. сформулировал и предложил концепцию эволюции Т4-родственных бактериофагов, связанную с неканоническими основаниями и экологическими нишами на базе модели Постоянного Разнообразия. В частности, Никулин Н.А. показал, что за счет влияния неканонических оснований и генов, способствующих воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК, происходит уменьшение возможностей горизонтального переноса генов с генетическим пулом экологических ниш, в результате чего в процессе эволюции образовались Т4-родственные фаги, наиболее приспособленные к экспансии одной экологической ниши, и фаги, наиболее

приспособленные к распространению по различным экологическим нишам. В качестве дополнительного доказательства предложенной концепции Никулин Н.А. провел исследования генов, способствующих воспроизведению фагов с неканоническими основаниями ДНК, в геномах других вирусов – в частности фагов *Acinetobacteria* и вирусов хлорелл, результаты которых подтвердили, что концепция может распространяться на другие группы вирусов. Также Никулиным Н.А. в ходе исследования была отмечена особенность наследования и положения генов, связанных с неканоническими основаниями у фагов: большинство генов синтеза 5-гидроксиметилцитозина между генами ДНК-полимеразы и хеликазы. Внутри данного участка ДНК показано наличие разных хоминг-эндонуклеаз. При этом, данное расположение характерно не только для группы Т4-родственных фагов, но и для фагов *Acinetobacteria* с неканоническими основаниями.

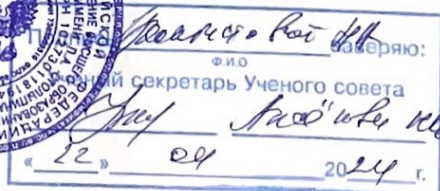
В заключении Никулиным Н. А. приводится обобщение результатов проведенной работы. Выводы логически следуют из полученных результатов и соответствуют целям и задачам исследования.

Исходя из представленных в работе данных, Никулиным Н.А. была проведена большая и сложная исследовательская работа. Выбранные методы, а также известные литературные данные не позволяют усомниться в достоверности полученных результатов. Никулиным Н.А. было впервые показано, что неканонические основания оказали колоссальное влияние на эволюцию Т4-родственных фагов. Также, на базе полученных Никулиным Н.А. результатов, в перспективе, можно разработать тесты для отбора Т4-родственных бактериофагов с неканоническими основаниями, в том числе и для конструирования фаговых биопрепаратов. Полученные Никулиным Н.А. результаты также имеют большое значение для разработок в области фаговой терапии. Т4-родственные бактериофаги с неканоническими основаниями могут стать достаточно перспективным вариантом для создания фаговых коктейлей.

Таким образом, новизна и практическая значимость работы Никулина Н.А. весьма высоки, имеют большой потенциал для молекулярной биологии и биотехнологии.

С учетом несомненной научной и практической значимости работы, не возникает сомнений в том, что ее автор достоин присуждения искомой ученой степени. Диссертационная работа хорошо оформлена и изложена структурировано и понятно. Тем не менее, к работе есть замечания, в основном связанные с опечатками и неточностями. В нескольких случаях отсутствует курсив в местах, где его необходимо использовать (например, в названии видов бактериофагов). В тексте представлена расшифровка аббревиатур, но в нескольких случаях она отсутствует в «Списке сокращений», для более удобного поиска их расшифровку стоило добавить в данный список. Однако вышеперечисленные замечания не влияют на оценку значения полученных результатов.

Также после прочтения диссертационной работы к автору есть ряд вопросов:



Сведения об официальном оппоненте

Фамилия Имя Отчество	Феоктистова Наталья Александровна
Гражданство	Российская Федерация
Ученая степень, наименование отрасли науки, научных специальностей, по которым защищена диссертация	кандидат биологических наук (03.00.07 – микробиология, 03.00.23 - биотехнология)
Учёное звание, специальность	доцент по кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы
Академическое звание	отсутствует
<i>Место работы:</i>	
Полное наименование организации (согласно уставу)	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина»
Сокращенное наименование организации (согласно уставу)	ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ
Ведомственная принадлежность организации	Министерство сельского хозяйства РФ
Тип организации	ВУЗ
Наименование структурного подразделения	кафедра микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы
Должность	Доцент
Почтовый адрес организации	432017, Ульяновская область, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1
Веб-сайт организации	https://ulsau.ru/
Адрес электронной почты	feokna@yandex.ru
Номер рабочего телефона	8-8422-55-95-47
Список основных публикаций официального оппонента в соответствующей сфере исследования в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет:	
<ol style="list-style-type: none"> Изучение генома и протеома бактериофага фитопатогенных бактерий <i>Pseudomonas syringae</i> / Н. А. Феоктистова, Е. В. Сульдина, И. И. Богданов, И. М. Абдурахманов // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2022. – № 1(57). – С. 99-105. – DOI 10.18286/1816-4501-2022-1-99-105 Определение размера нуклеиновых кислот бактериофагов Ps.S-7 УлГАУ и Ps.S-27 УлГАУ / Н. А. Феоктистова, Е. В. Сульдина, А. В. Мاستиленко, И. М. Абдурахманов // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2021. – № 4(56). – С. 136-141. – DOI 10.18286/1816-4501-2021-4-136-141. Майоров, П. С. Технология изготовления и контроля фагового биопрепарата <i>Xanthomonas campestris</i> / П. С. Майоров, Н. А. Феоктистова, О. С. Майоров // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2021. – № 4(56). – С. 91-95. – DOI 10.18286/1816-4501-2021-4-91-95. Разработка метода фагоиндикации бактерии <i>Pseudomonas syringae</i> в объектах санитарного надзора / Н. А. Феоктистова, А. К. Беккалиева, Д. А. Васильев, Е. В. Сульдина // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. – № 3(51). – С. 148-157. – DOI 10.18286/1816-4501-2020-3-148-157. Применение реакции нарастания титра фагов для обнаружения бактерии мягкой гнили / Б. Ж. Рыскалиева, Д. А. Васильев, Н. А. Феоктистова, Е. А. Ляшенко // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. – 2020. – № 3-2. – С. 26-28 	

6. Беккалиева, А. К. Изучение некоторых свойств выделенных бактериофагов *Pseudomonas syringae* / А. К. Беккалиева, **Н. А. Феоктистова**, Д. А. Васильев // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. – 2020. – № 3-2. – С. 11-13.
7. Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага *Listeria Fl.m 4* УлГАУ / Е. В. Сульдина, А. В. Мاستиленко, **Н. А. Феоктистова**, Д. А. Васильев // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2019. – № 4(48). – С. 129-135. – DOI 10.18286/1816-4501-2019-4-129-135.
8. Феоктистова, Н. А. Разработка системы детекции HBL Enterotoxin в геноме бактериофагов *Bacillus pumilis* / **Н. А. Феоктистова** // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2019. – № 3(47). – С. 124-130. – DOI 10.18286/1816-4501-2019-3-124-130.
9. Бактериофаги *Pectobacterium carotovorum*: выделение, параметры культивирования и биологические особенности / Б. Ж. Рыскалиева, Д. А. Васильев, **Н. А. Феоктистова**, Е. А. Ляшенко // Естественные и технические науки. – 2019. – № 8(134). – С. 33-38.
10. Майоров, П. С. Разработка схемы выделения бактериофагов *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* / П. С. Майоров, **Н. А. Феоктистова**, Д. А. Васильев // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. – 2019. – № 6. – С. 20-25.
11. Протеомный анализ бактериофага YE 3-f2, специфичного для бактерий *Yersinia enterocolitica* / Д. А. Васильев, **Н. А. Феоктистова**, А. В. Мастиленко, Е. В. Сульдина // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2019. – № 2(46). – С. 132-139. – DOI 10.18286/1816-4501-2019-2-132-139
12. Разработка систем ПЦР - детекции бактериофагов *Proteus* phage (PR 4 - угсха), *Enterobacter* phage (E7) и *Yersinia* phage (YE 3-f2) / Е. В. Сульдина, **Н. А. Феоктистова**, Д. А. Васильев, А. В. Мастиленко // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2019. – № 2(46). – С. 140-146. – DOI 10.18286/1816-4501-2019-2-140-146
13. Анализ протеома бактериофага, активного в отношении *Enterobacter* / **Н. А. Феоктистова**, Д. А. Васильев, А. В. Мастиленко, Е. В. Сульдина // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2019. – № 2(46). – С. 147-154. – DOI 10.18286/1816-4501-2019-2-147-154.
14. Proteomic Analysis Of Bacteriophage Pr – 6 UGSHA / **N. A. Feoktistova**, D. A. Vasilyev, A. V. Mastilenko [et al.] // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2019. – Vol. 10, No. 2. – P. 1580-1587.

Доцент кафедры микробиологии,
вирусологии, эпизоотологии и
ветеринарно-санитарной экспертизы
Федерального государственного
бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Ульяновский государственный
аграрный университет имени П.А.
Столыпина»
к.б.н.

Подпись Феоктистова Н.А.
ф.и.о.
Ученый секретарь Ученого совета
Н.Н. Аксенов
«26» 03 2024 г.



Феоктистова Н. А.
«26» марта 2024 г.

Уважаемый Евгений Евгеньевич!

Подтверждаю, что не являюсь соавтором соискателя ученой степени по опубликованным работам по теме диссертации, а также работником (в том числе работающие по совместительству) организаций, где выполнялась диссертация или работает соискатель ученой степени, его научный руководитель, а также где ведутся научно-исследовательские работы, по которым соискатель ученой степени является руководителем или работником организации-заказчика или исполнителем (соисполнителем).

Согласна на обработку моих персональных данных, на размещение моего отзыва на диссертацию Никулина Никиты Алексеевича на тему: «Эволюционная дивергенция T4-родственных бактериофагов, связанная с неканоническими азотистыми основаниями ДНК» и документа «Сведения об официальном оппоненте» на сайте ФИЦ ПНЦБИ РАН. Ознакомлена с тем, что отзыв на диссертацию должен быть передан в Диссертационный совет не позднее, чем за 15 дней до дня защиты диссертации.

Феоктистова Н. А.

Подпись Н.Н.Аксенов Секретарь
Ф.И.О.
Ученый секретарь Ученого совета
Н.Н.Аксенов
«26» 03 2024 г.



« 26 » марта 20 24 г.