

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
по диссертации на соискание ученой степени доктора наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 03.04.2024 г. № 8

О присуждении **Шагину Дмитрию Алексеевичу**, гражданину РФ, ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация «**Термостабильная дезоксирибонуклеаза из *Paralithodes camtschaticus* – новый инструмент исследования сложных геномов**» принята к защите 20.12.2023 г. (протокол № 33) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) (ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997, Приказ Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013, а также Приказ Минобрнауки России № 561 от 03.06.2021 г.).

Соискатель **Шагин Дмитрий Алексеевич**, 31 января 1968 года рождения. Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук «Семейство генов полидоменных лектинов С-типа планарии *Dugesia tigrina*» по специальности 03.00.03 – «молекулярная биология» защитил в 2001 году в диссертационном совете, созданном на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, диплом кандидата наук серия КТ № 065762.

В настоящее время Шагин Д.А. работает проректором по инновационной деятельности ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Диссертация выполнена в лаборатории молекулярных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный консультант– доктор биологических наук, академик РАН Лукьянов Сергей Анатольевич, ректор ФГАОУ ВО «Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, зав. Отделом геномики и постгеномных технологий ИБХ РАН.

Официальные оппоненты:

Янковский Николай Казимирович - доктор биологических наук, профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова

Российской академии наук; **Лазарев Василий Николаевич** - доктор биологических наук, доцент, заместитель генерального директора по научной работе ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства»; **Михайлович Владимир Михайлович** - доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биологических микрочипов ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация **Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии гена Российской академии наук»**, в своем *положительном* отзыве, подписанном ведущим научным сотрудником Лаборатории пространственной организации генома Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии гена Российской академии наук» д.б.н. Гавриловым Алексеем Александровичем, и утвержденном директором Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии гена Российской академии наук» д.б.н., академиком РАН Георгиевым Павлом Георгиевичем, указал, что диссертационная работа Шагина Дмитрия Алексеевича «Термостабильная дезоксирибонуклеаза из *Paralithodes camtschaticus* – новый инструмент исследования сложных геномов» соответствует требованиям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, а Шагин Дмитрий Алексеевич заслуживает присвоения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Соискатель имеет 75 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 16 работ общим объемом 12 печатных листов в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендуемых Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций, в том числе, 1 обзорная статья, получено два международных патента, написано 3 главы в книгах. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Наиболее значимые научные работы по теме диссертации, в которые соискатель внес основной, либо существенный вклад:

1. Petzold A, Reichwald K, Groth M, Taudien S, Hartmann N, Priebe S, **Shagin D**, Englert C, Platzer M. The transcript catalogue of the short-lived fish *Nothobranchius furzeri* provides insights into age-dependent changes of mRNA levels // BMC genomics. 2013. Vol. 14. P. 1-16.
2. Kirschner J, Weber D, Neuschl C, Franke A, Böttger M, Zielke L, Powalsky E, Groth M, **Shagin D**, Petzold A, Hartmann N, Englert C, Brockmann GA, Platzer M, Cellerino A, Reichwald K. Mapping of quantitative trait loci controlling lifespan in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*- a new vertebrate model for age research // Aging Cell. 2012. Vol. 11, № 2. P. 252-261.
3. Богданова Е.А., И. А. Шагина, Ю. Г. Янушевич, Л.Л. Вагнер, С. А. Лукьянов, **Д. А. Шагин**. Подготовка кДНК прокариот для широкомасштабного анализа транскриптома // Биоорг. химия. 2011.Т. 37, № 6. С. 854-857.
4. Шагина И.А., Е. А. Богданова, И. М. Альтшулер, С. А. Лукьянов, **Д. А. Шагин**. Использование дуплекс-специфической нуклеазы краба для быстрого анализа

- однонуклеотидных полиморфизмов и выявления ДНК-мишеней в комплексном продукте ПЦР // Биоорг. химия. 2011. Т. 37, № 4. С. 522-529.
5. Shagina I, Bogdanova E, Mamedov IZ, Lebedev Y, Lukyanov S, **Shagin D**. Normalization of genomic DNA using duplex-specific nuclease // Biotechniques. 2010. Vol. 48, № 6. P. 455-459.
 6. Bogdanova EA, Shagina IA, Mudrik E, Ivanov I, Amon P, Vagner LL, Lukyanov SA, **Shagin DA**. DSN depletion is a simple method to remove selected transcripts from cDNA populations // Mol Biotechnol. 2009. Vol. 41, № 3. P. 247-253.
 7. Anisimova VE, Shcheglov AS, Bogdanova EA, Rebrikov DV, Nekrasov AN, Barsova EV, **Shagin DA**, Lukyanov SA. Is crab duplex-specific nuclease a member of the Serratia family of non-specific nucleases? // Gene. 2008. Vol. 418, № 1-2. P. 41-48.
 8. Anisimova VE, Rebrikov DV, **Shagin DA**, Kozhemyako VB, Menzorova NI, Staroverov DB, Ziganshin R, Vagner LL, Rasskazov VA, Lukyanov SA, Shcheglov AS. Isolation, characterization and molecular cloning of Duplex-Specific Nuclease from the hepatopancreas of the Kamchatka crab // BMC biochemistry. 2008. Т. 9, №. 1. С. 1-12.
 9. Bogdanova EA, **Shagin DA**, Lukyanov SA. Normalization of full-length enriched cDNA // Mol Biosyst. 2008. Vol. 4, № 3. P. 205-212.
 10. Volik S, Raphael BJ, Huang G, Stratton MR, Bignel G, Murnane J, Brebner JH, Bajsarowicz K, Paris PL, Tao Q, Kowbel D, Lapuk A, **Shagin DA**, Shagina IA, Gray JW, Cheng JF, de Jong PJ, Pevzner P, Collins C. Decoding the fine-scale structure of a breast cancer genome and transcriptome // Genome Res. 2006. Vol. 16, № 3. P. 394-404.
 11. Diatchenko L, Slade GD, Nackley AG, Bhalang K, Sigurdsson A, Belfer I, Goldman D, Xu K, Shabalina SA, **Shagin D**, Max MB, Makarov SS, Maixner W. Genetic basis for individual variations in pain perception and the development of a chronic pain condition // Hum Mol Genet. 2005. Vol. 14, № 1. P. 135-143.
 12. И. М. Альтшулер, П. А. Жулидов, Е. А. Богданова, Н.Н. Мудрик, **Д. А. Шагин**. Использование метода DSNP для изучения точечных мутаций генов человека // Биоорг. химия. 2005. Т. 31, № 6. С. 627-636.
 13. Жулидов П.А., Е. А. Богданова, А. С. Щеглов, И. А. Шагина, Л. Л. Вагнер, Г. Л. Хазпеков, В. В. Кожемяко, С. А. Лукьянов, **Д. А. Шагин**. Метод создания нормализованных библиотек кДНК, обогащенных полноразмерными последовательностями // Биоорг. химия. 2005. Т. 31, № 2. С. 186-194.
 14. Zhulidov PA, Bogdanova EA, Shcheglov AS, Vagner LL, Khaspekov GL, Kozhemyako VB, Matz MV, Meleshkevitch E, Moroz LL, Lukyanov SA, **Shagin DA**. Simple cDNA normalization using kamchatka crab duplex-specific nuclease // Nucleic Acids Res. 2004. Vol. 32, № 3. P. e37.
 15. **Shagin DA**, Rebrikov DV, Kozhemyako VB, Altshuler IM, Shcheglov AS, Zhulidov PA, Bogdanova EA, Staroverov DB, Rasskazov VA, Lukyanov S. A novel method for SNP detection using a new duplex-specific nuclease from crab hepatopancreas // Genome Res. 2002. Vol. 12, № 12. P. 1935-1942.
 16. **Д.А. Шагин**, Д.В. Ребриков. Применение дуплекс-специфической нуклеазы из камчатского краба в методах молекулярной биологии (обзор) // Вестник РГМУ. 2022. Т. 1. С. 5-11.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента Янковского Н.К., отзыв положительный содержит следующие замечания: 1. В первой части обзора литературы дается обширная и подробная характеристика известных на настоящее время семейств нуклеаз, механизмов их катализа, субстратной специфичности нуклеаз и т.д. Возможно сокращение текста литературного обзора путем концентрации внимания на суперсемействе His-Me нуклеаз, к которым автор отнес Par_DSN и ее гомологи, облегчило бы восприятие информации. 2. В чем, по мнению автора, биологический смысл уникальных свойств (специфичности, термостабильности, устойчивости к протеиназам) открытого и описанного им фермента? 3. Выявленная автором

температурный оптимум *Par_DSN* при гидролизе двухцепочечной ДНК – 60°C. При этом в технологиях с использованием нуклеазы краба, разработанных автором, температурный режим в случае с методами выявления мутаций – 30°-37°C, а в случае с нормализациями или деплециями – 65°- 68°C. С чем это связано? 4. В тексте диссертации автор отмечает, что разработанные им технологии нормализации нашли широкое применение при подготовке образцов ДНК для высокопроизводительного секвенирования. При этом ни в главе «Материалы и методы», ни в главе «Результаты и обсуждения» не представляет информации, есть ли какая-либо особая специфика нормализации перед NGS. 5. Предложенная автором диссертации технология удаления рРНК в транскриптоме прокариотического организма впечатляет. Не понятно, правда, почему сохранение профиля экспрессии генов в истощенных по рРНК библиотеках бактериальных кДНК автор подтверждает супрессионной вычитающей гибридизацией, а не полномасштабным секвенированием?

2. Отзыв официального оппонента Лазарева В.Н., отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1. Хотя вся диссертационная работа посвящена изучению фермента, очищенного из природного источника, мне не удалось обнаружить не электрофореграмм в ПААГ, ни хроматограмм, которые могли бы свидетельствовать о степени очистки препарата. 2. Коллегам диссертанта удалось преодолеть проблему получения активного рекомбинантного белка дуплекс-специфической нуклеазы краба с помощью сложной схемы ренатурации и активации. Предпринимались ли попытки получить целевой фермент в других системах экспрессии (дрожжи, клетки млекопитающих)? 3. Анализируя структуру *Par_DSN* и ее гомологов, автор вводит аббревиатуру «КР», не расшифровывая ее, что вызывает субъективное неудобство при анализе результата исследования. 4. В представленных автором экспериментальных данных гибридизация нормализованных образцов кДНК с олигонуклеотидными пробами на микро- и макрочипе демонстрирует падение концентрации ряда последовательностей до не детектируемого уровня. Чем это можно объяснить? 5. В электронном варианте диссертации хотелось бы иметь возможность перехода по ссылке из текста на авторов и название статей в обзоре литературы. 6. Периодически по тексту встречаются жаргонизмы: «режут», «разрезы» и т.д.

3. Отзыв официального оппонента Михайловича В.М., отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1. В тексте диссертации на стр.159 присутствует несоответствие температуры инкубации (70°C) нуклеазы камчатского краба с отсылкой к рисункам 3.9 и 3.10 с температурой, указанной в подписи к самим рисункам (65°C). 2. На рисунке 3.15 (стр. 165) для корректности эксперимента не хватает отрицательного контроля, представленного смесью радиоактивно меченных оц-ДНК и оц-РНК без обработки нуклеазой краба. 3. В работе была продемонстрирована специфичность гидролиза с помощью *Par_DSN* флуоресцентно меченого зонда на матрице ДНК длиной 4000 пар оснований. При этом фермент «распознавал» однонуклеотидную замену среди 4000 оснований последовательности

ДНК. Не натолкнуло это диссертанта на мысль о создании подобия «примитивного секвенатора»? 4. Насколько, по мнению автора, технология геномной нормализации с помощью крабовой нуклеазы может быть применима к исследованию бактериальных сообществ? 5. В работе автором была продемонстрирована возможность идентификации с помощью Paq_DSN и специфического ДНК-зонда заданной последовательности в молекуле РНК. Почему это не нашло продолжения в виде создания технологии? 6. Латинские названия видов принято писать курсивом.

4. Отзыв ведущей организации, отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. Зачем камчатскому крабу, живущему в среде с низкими температурами термостабильный фермент? 2. Были ли попытки создания технологии вычитающей гибридизации полноразмерной кДНК с использованием дуплекс-специфической нуклеазы из камчатского краба? 3. На рисунке 3.13 «Анализ расщепления синтетических радиоактивно меченых дц ДНК субстратов нуклеазой камчатского краба» фигурирует «п.о.» – пара оснований, хотя правильнее было использовать «н.о.» – нуклеотидное основание. 4. В работе присутствует ряд опечаток.

5. Отзыв на автореферат доктора биологических наук **Ажикиной Татьяны Леодоровны**, главного научного сотрудника лаборатории регуляторной транскриптомики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

6. Отзыв на автореферат доктора биологических наук, профессора, член-корреспондента РАН **Купраша Дмитрия Владимировича**, главного научного сотрудника лаборатории передачи внутриклеточных сигналов в норме и патологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН. Отзыв положительный, содержит следующее замечание: хотелось бы заметить, что на ключевую статью 2004 года в NAR в РИНЦ обнаруживается более 300 ссылок, что само по себе говорит о важности работы Дмитрия Алексеевича. Интересно, что в динамике цитирования наблюдается экспоненциальный рост с резким падением в 2014 году и еще одним падением в последние 2 года. Здесь можно предположить связь либо с удешевлением технологий глубокого секвенирования (NGS), либо с появлением альтернативных методов обогащения библиотек кДНК, либо со сложностями выхода разработанных коммерческих наборов на международные рынки. Такого рода вещи естественны для такой бурно развивающейся области, как молекулярная биология, и напрямую не относятся к научному содержанию рассматриваемой работы, тем не менее, было бы интересно услышать соображения Дмитрия Алексеевича по данному вопросу.

7. Отзыв на автореферат доктора биологических наук **Шевелева Алексея Борисовича**, заведующего лабораторией ДНК-метилома и редактирования транскриптома ФГБУН

Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН. Отзыв положительный, содержит следующее замечания: 1. В 2020 (Nong et al.) в открытом доступе появились данные анализа транскриптома *P. camtschaticus*, а в 2021 г - результаты полногеномного секвенирования ДНК этого организма (Veldsman et al.). Однако, диссертант не воспользовался ими и не провёл анализ геномной последовательности, кодирующей Par_DSN, и его транскрипта, хотя такой анализ не является трудоёмким и существенно расширил бы понимание биологической роли фермента, открытого в ходе ее реализации. Более того, на наш взгляд, автор не уделил должного внимания биологической функции Par_DSN. Между тем, такой анализ позволил бы лучше понять значение уникальных характеристик Par_DSN и способствовал бы облегчению поиска его функциональных аналогов с близкими, но отличающимися характеристиками. 2. В работе следовало бы уделить большее внимание принципам подбора условий использования Par_DSN при конструировании библиотек, особенно, кинетическим и концентрационным зависимостям результатов таких экспериментов. Восприятие работы сильно облегчилось бы, если бы автором было указано, на каком расстоянии от неспаренного нуклеотида в ДНК-дуплексе обеспечивается защита от деградации Par_DSN.

8. Отзыв на автореферат доктора биологических наук **Каменского Петра Андреевича**, профессора биологического факультета федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова». Отзыв положительный, содержит следующее предложение: Интерес представляет анализ взаимодействия фермента с гибридами ДНК-РНК различной степени комплементарности. Полагаю, что такого рода исследование позволило бы еще глубже понять уникальные свойства нуклеазы краба и расширить область ее применения.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их достижениями в областях науки, соответствующих теме диссертации. Это подтверждается наличием у них большого количества публикаций в ведущих международных и российских изданиях. В стенах Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии гена Российской академии наук» продолжительное время ведутся исследования в области анализа транскриптомов и геномов различных организмов, анализа однонуклеотидных полиморфизмов, изучения структуры и функции белков, изучения бактериальных сообществ. Янковский Н.К. является одним из лучших специалистов в стране в вопросах, касающихся молекулярной генетики человека, в частности, изучения однонуклеотидных полиморфизмов, анализа транскриптома и генома человека и т.д. Лазарев В.Н. является специалистом в области структуры и функций ферментов. Научные интересы Михайловича В.М. лежат в области молекулярных технологий, исследования генетики бактерий, связи полиморфизмов с онкологическими заболеваниями человека. Наличие большого опыта, а также высокая квалификация в данных областях позволяют

представителям ведущей организации и оппонентам объективно оценивать теоретическую и практическую значимость диссертационной работы, а также ее новизну.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных Шагиным Д.А. исследований была клонирована полноразмерная кодирующая последовательность нового фермента из гепатопанкреаса камчатского краба – дуплекс-специфическая нуклеаза (Par_DSN). Был проведен детальный анализ физико-химических свойств природного фермента. В результате была выявлена высокая термостабильность нуклеазы краба, селективная избирательность фермента по отношению к дц ДНК, высокая специфичность к однонуклеотидным заменам. Шагиным Д.А. Был проведен сравнительный анализ последовательностей Par_DSN и ее гомологов из других членистоногих (в том числе клонированных полноразмерных кодирующих последовательностей нуклеаз еще из трех видов ракообразных) с нуклеазами SNF; построено древо филогенетического родства, продемонстрировавшее разделение на клады «классических» SNF нуклеазы и DSN-подобных нуклеаз. Автором был выявлен ряд серьезных отличий в структуре Par_DSN-подобных нуклеаз и нуклеаз SNF. Par_DSN-подобные нуклеазы обнаруживали в своем составе более протяженные нуклеазные домены, у них наблюдались принципиальные отличия в структуре каталитического центра, имелся протяженный консервативный регион, расположенный между сигнальным пептидом и нуклеазным доменом. На основе этих отличий, а также древа филогенетического родства было предложено выделить DSN-подобные нуклеазы в новое семейство – Дуплекс специфических нуклеаз внутри суперсемейства His-Me нуклеаз. Был проведен анализ нуклеазной активности сконструированных укороченных форм Par_DSN, а также рекомбинантных мутантных белков, что позволило выявить ключевые структуры нуклеазы краба, ответственные за специфичность к дц ДНК и термостабильность. На основе уникальных свойств Par_DSN соискателем были разработаны новые высокоэффективные технологии: анализа ОНП в генах эукариот, выявления целевых ДНК-мишеней в комплексной смеси нуклеиновых кислот, нормализации кДНК и геномной ДНК, селективного удаления нецелевых транскриптов из популяций кДНК эукариотических организмов и удаления последовательностей рРНК при создании библиотек кДНК прокариотических организмов. Разработанные Шагиным Д.А. технологии нашли свое применение в совместных работах в рамках международного научного консорциума по исследованию хронической боли, международной программы по исследованию рака молочной железы, в рамках проекта по изучению механизмов старения, и были высоко оценены зарубежными коллегами.

Теоретическая значимость исследования состоит в том, что в представленной работе впервые в мире был клонирован и охарактеризован термостабильный фермент, обладающий непревзойденной селективностью по отношению к дц ДНК. Было открыто новое семейство – Дуплекс специфических нуклеаз. Было выдвинуто предположение о дивергентном расхождении в эволюции Дуплекс специфических нуклеаз и нуклеаз SNF. Было

постулировано, что нуклеазы с дц ДНКазной активностью могут быть найдены у других членистоногих, что и было в дальнейшем подтверждено рядом работ независимых лабораторий. Внутри белка были выявлены структуры, ответственные за специфические активности нуклеазы камчатского краба. Уникальные свойства Par_DSN послужили толчком для разработки целого спектра молекулярно-биологических технологий анализа сложных смесей нуклеиновых кислот.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики заключается в том, что нуклеаза камчатского краба, а также технологии, разработанные Шагиным Д.А. на основе уникальных свойств этого фермента, легли в основу создания ряда коммерчески доступных продуктов, что привело к широкому внедрению полученных в исследовании результатов в мировую лабораторную практику. Методы нормализации и деплеции с использованием Par_DSN стали методами выбора при подготовке биологических образцов для высокопроизводительного секвенирования. Также на основе разработанных Шагиным Д.А. технологий, рядом западных лабораторий были предложены новые методы анализа микро РНК.

Достоверность полученных в работе результатов не вызывает сомнений. Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, а результаты исследования являются воспроизводимыми в различных условиях. Методы исследований, использованные соискателем, являются общепринятыми и выполнены на современном оборудовании. Эффективность разработанных соискателем технологий подтверждалась независимыми методами, такими как секвенирование по Сэнгеру, высокопроизводительное секвенирование, рестрикционный анализ, амплификация в режиме реального времени. Для анализа последовательностей нуклеиновых кислот и аминокислот применялись стандартные пакеты программ и программные продукты

Личный вклад соискателя состоит в том, что им был разработан общий дизайн исследования и предложена стратегия клонирования дуплекс-специфической нуклеазы и ее гомологов, ему принадлежит ведущая роль в систематизации и обработке результатов экспериментов, координации и продвижении исследований, выполнении основных частей экспериментальной работы. Соискатель является автором всех предложенных технологий с использованием Par_DSN и их модификаций.

На основании вышеизложенного Диссертационный совет 24.1.037.01 заключает, что диссертационная работа **Шагина Дмитрия Алексеевича** «Термостабильная дезоксирибонуклеаза из *Paralithodes camtschaticus* – новый инструмент исследования сложных геномов», представленная на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология, является законченным научно-квалификационным исследованием в области молекулярной биологии, в результате которого были получены новые фундаментальные знания об уникальном ферменте – термостабильной

дуплекс-специфической нуклеазе камчатского краба, новом семействе Дуплекс специфических нуклеаз, а также разработаны технологии анализа сложных смесей нуклеиновых кислот. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, личному вкладу и полноте изложения результатов диссертация полностью удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым к докторским диссертациям «Положением о присуждении учёных степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; от 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук.

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

1. Зачем камчатскому крабу такая мощная нуклеаза?
2. Есть ли адаптивный иммунитет у ракообразных?
3. Есть ли модели пространственной структуры нуклеазы краба в комплексе с дц ДНК, и как ферменту удается осуществлять свои функции с точки зрения структуры?
4. Использовался ли для выявления доменов белка метод микрокалориметрии? И происходит ли отщепление ли сигнального пептида нуклеазы краба в природе.
5. Не может ли быть так, что в естественных условиях среды обитания камчатского краба специфическая активность фермента может быть иной, чем при повышенных температурах, используемых в экспериментах?
6. Зачем камчатскому крабу, живущему в среде с низкими температурами, термостабильный фермент?
7. Были ли попытки создания технологии вычитающей гибридизации полноразмерной кДНК с использованием дуплекс-специфической нуклеазы из камчатского краба?
8. Предпринимались ли попытки получить целевой фермент в других системах экспрессии (дрожжи, клетки млекопитающих)?
9. Не натолкнула ли на мысль о создании «примитивного секвенатора» высокая специфичность Par_DSN к совершенным дуплексам ДНК?
10. Насколько технология геномной нормализации с помощью крабовой нуклеазы может быть применима к исследованию бактериальных сообществ?
11. Почему продемонстрированная в работе возможность идентификации с помощью Par_DSN заданной последовательности РНК не нашла продолжения в виде технологии?
12. В динамике цитирования статей по использованию Par_DSN наблюдается экспоненциальный рост с резким падением в 2014 г. и еще одним падением в последние 2 года. С чем это может быть связано?

Соискатель Шагин Д.А. ответил на задаваемые ему в ходе заседания вопросы:

1. Мы полагаем, что дуплекс-специфическая нуклеаза представляет собой первый рубеж защиты от дц ДНК-вирусов, в частности, возбудителя синдрома белых пятен, а также других дц ДНК-вирусов ракообразных.
2. Предполагаю, что есть, хотя могу ошибаться. Для меня в пользу этого говорит адаптация креветок к вирусу белых пятен креветок.
3. Нами была сделана структура дуплекс-специфической нуклеазы краба с помощью программы AlphaFold. Предсказанная этим методом структура нуклеазы камчатского краба подтвердила наши данные, полученные с помощью других программ. Данные AlphaFold согласуются с экспериментально полученными результатами по изменению термостабильности, специфичности к дц ДНК, обнаруженных нами с помощью делеционного и сайт-направленного мутагеза. Модель пространственной структуры нуклеазы краба в комплексе с дц ДНК нам пока получить не удалось. Но пространственное выравнивание Par_DSN с нуклеазой EXOG демонстрирует, по всей видимости, сходное с нуклеазой EXOG расположение дц ДНК.
4. Метод микрокалориметрии в своей работе не использовали. Границы доменов определяли с помощью метода А. Некрасова и AlphaFold. Сигнальный пептид отщепляется.
5. Специфическая активность Par_DSN по отношению к дц ДНК проявляется в широком диапазоне температур, в том числе и при температуре ниже 20°C.
6. В данном случае термостабильность является следствием стабильности белка, функционирующего в агрессивной среде пищеварительной системы краба. Сама по себе термостабильность нуклеазы краба для жизнедеятельности организма не нужна.
7. Нам частично удалось реализовать такую технологию с использованием в качестве драйвера полиА РНК. Но поскольку мРНК представляет собой достаточно дорогой и часто недоступный в необходимых количествах материал, мы прекратили эти эксперименты.
8. В клетках млекопитающих нет. В дрожжах был получен активный фермент, обладающий теми же свойствами, что и природная нуклеаза краба.
9. Думали и пытались. Но после того, как столкнулись с технологическими проблемами «пришивки» нуклеотидных флуоресцентных зондов–мишеней на твердую фазу, прекратили эту работу.
10. Публикации свидетельствуют об удачном применении такого рода технологии для исследования бактериальных сообществ.
11. Мы заявили и продемонстрировали такую возможность, а западные коллеги реализовали нашу идею в многочисленных методах по анализу микро РНК (так называемых «биосенсорах микро РНК на основе DSN»).
12. Отчасти с удешевлением технологий NGS. Но также и с перекрытием каналов поставок наборов реагентов отечественного производства за границу.

На заседании 03 апреля 2024 года диссертационный совет принял решение: за проведение фундаментальных исследований дуплекс-специфической нуклеазы из камчатского краба, открытие нового семейства нуклеаз, а также за создание целого спектра прорывных молекулярных технологий для изучения сложных смесей ДНК/РНК, совокупность чего можно квалифицировать как научное достижение в области молекулярной биологии, присудить Шагину Дмитрию Алексеевичу ученую степень доктора биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 22 человек, из них 7 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3 – молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 22, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.



03 апреля 2024 г.