

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Шагина Дмитрия Алексеевича на тему **«Термостабильная дезоксирибонуклеаза из *Paralithodes camtschaticus* – новый инструмент исследования сложных геномов»**, представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Представленный на рецензию автореферат диссертации Д.А. Шагина посвящен актуальной в теоретическом и практическом отношении проблематике - идентификации и характеристике термостабильной нуклеазы камчатского краба *Paralithodes camtschaticus*, обладающей уникальной избирательностью действия по отношению к двуцепочечной, но не к одноцепочечной ДНК, а также не способной к разрушению РНК. Теоретическая значимость работы обусловлена, в первую очередь, редкостью обнаруженных у фермента Par_DSN энзиматических характеристик: высокой удельной активностью, избирательностью в отношении дцРНК, полной неспособностью расщеплять несовершенные ДНК-дуплексы, термостабильностью и протеолитической стабильностью. В своем исследовании автор уделил должное внимание теоретическим вопросам, связанным с изучением структурных основ выявленных редких и ценных свойств Par_DSN. Практическая значимость работы связана с возможностью использования Par_DSN в качестве инструмента для создания и анализа библиотек нуклеиновых кислот: нормализации, вычитающей гибридизации, сокращения доли массово встречающихся повторов в геноме и других, а также в качестве средства анализа полиморфизма геномов. Высокая практическая значимость работы подтверждена наличием у автора зарубежных патентов и присутствием фермента в каталогах ведущих коммерческих фирм. Необходимо отметить, что за время, прошедшее с момента открытия Par_DSN перспективность его использования не только не снизилась, но и существенно выросла, что обусловлено развитием методов высокопроизводительного секвенирования. Таким образом, потребность в инструментах для изготовления и анализа библиотек РНК и ДНК увеличилась, а коммерчески доступных аналогов Par_DSN до настоящего времени не появилось.

Компоновка работы Д.А. Шагина является классической. Текст автореферата хорошо оформлен и дает ясное представление о целях задачах, методах и результатах работы. Выводы отражают основное содержание работы и полностью основаны на представленных результатах. При выполнении работы автор использовал широкий арсенал современных методов молекулярной биологии – анализ последовательностей белка, ПЦР с использованием оригинальных высокоэффективных методик, различные способы очистки белка, методы определения активности ферментов нуклеинового обмена с применением радиоактивных изотопов и флуоресцентных меток. Несомненно сильной стороной работы является широкий набор разработанных и апробированных автором методов применения открытого им фермента для конструирования и анализа библиотек РНК и ДНК.

Результаты диссертационной работы Д.А. Шагина представлены к ознакомлению научной общественности в 21 публикациях, включая статьи в ведущих научных журналах и главы в книгах международных изданий. Исключительно высокий уровень работы подтверждается наличием у автора двух международных патентов по тематике исследования.

В качестве замечаний к работе можно высказать следующее:

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 способствовало 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, если бы автором было указано, на каком расстоянии от неспаренного нуклеотида в ДНК-дуплексе обеспечивается защита от деградации Par_DSN.

Высказанные замечания носят исключительно дискуссионный характер. Общее впечатление от работы остается исключительно благоприятным: ее объем и научный уровень можно назвать выдающимися. Работа полностью соответствует паспорту специальности «Молекулярная биология».

С учетом изложенного, можно сделать вывод, что диссертационная работа Шагина Д.А. полностью соответствует критериям, предъявляемым к докторским диссертациям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г., а ее автор Д.А. Шагин заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

27 марта 2024 г

Заведующий лабораторией ДНК-метилома
и редактирования транскриптома
ФГБУН Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН
Тел. +7 499 132 89 60
Эл. почта shevelab@vigg.ru
Москва, 119333б ул. Губкина, д. 3



УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
Д. Б. Н
ГОРЯЧЕВА И.И.

Подпись
удостоверяю

Д.б.н. Шевелев Алексей Борисович