

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук
(ИБГ РАН)

Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334

Тел.: (499)135-60-89, (499)135-98-84 Факс: (499)135-41-05

e-mail: info@genebiology.ru; <http://www.genebiology.ru>

ОКПО 00244660 ОГРН 1027739618037 ИНН/ КПП 7736020369/773601001

1 марта 2024 года № 12318 - 51

На № от



ОТЗЫВ

Ведущей организации на диссертационную работу Шагина Дмитрия Алексеевича на тему «Термостабильная дезоксирибонуклеаза из *Paralithodes camtschaticus* – новый инструмент исследования сложных геномов», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Многочисленные технологические прорывы в молекулярной биологии часто связаны с открытием и внедрением в практику ферментов, обладающих новыми активностями или ранее не описанными комбинациями свойств. Нуклеазы являются группой ферментов, которые широко используются в биотехнологии и медицине. Однако среди нуклеаз, применяемых на момент инициации данной диссертационной работы, отсутствовали клонированные термостабильные ферменты, способные избирательно разрушать только двухцепочечную (дц) ДНК, сохраняя одноцепочечную (оц) ДНК и РНК неповрежденными. В то же время фермент с такой активностью был высоко

востребован для разработки ряда технологий анализа сложных смесей нуклеиновых кислот.

Актуальность и значимость диссертационной работы Шагина Д.А. заключается в выявлении и клонировании дуплекс-специфической нуклеазы из камчатского краба (Par_DSN), обладающей уникальными свойствами, с последующим созданием на ее основе новых молекулярных технологий, а также в выявлении и характеристике нового семейства дуплекс-специфических нуклеаз.

Представленные в работе результаты носят как важный теоретический характер, так и имеют практическую значимость. Данные диссертационной работы Шагина Д.А. легли в основу ряда коммерчески доступных продуктов, что привело к широкому внедрению полученных в исследовании результатов в мировую лабораторную практику. Так, нормализация и деплеция с использованием Par_DSN стали методами выбора при подготовке биологических образцов для высокопроизводительного секвенирования.

Диссертационная работа Шагина Д.А. написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы. Работа изложена на 342 страницах машинописного текста, включает 32 таблицы и 78 рисунков.

Обзор литературы состоит из двух основных частей. Первая часть посвящена общей характеристике ферментов, расщепляющих нуклеиновые кислоты, описанию различных семейств нуклеаз, механизму действия нуклеаз. Во второй части литературного обзора рассматриваются технологии, связанные с работой с нуклеиновыми кислотами: нормализация, удаление нецелевых транскриптов, а также методы анализа генетических полиморфизмов и выявления целевых последовательностей нуклеиновых кислот.

В главе, посвященной экспериментальной части, представлено подробное описание методов, использованных в работе.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из трех подразделов.

Первый раздел посвящен клонированию полноразмерной кДНК дуплекс-специфической нуклеазы из камчатского краба; очистке природной Par_DSN, с подтверждением идентичности первичной структуры выделенного белка и аминокислотной последовательности, предсказанной по клонированной кодирующей нуклеотидной последовательности; анализу уникальных физико-химических свойств выделенного природного фермента – термостабильности (температурный оптимум ~60°C, сохранение 40% активности при прогревании в течение 30 минут при температуре 80°C), селективной избирательности по отношению к дц ДНК, высокой устойчивости к обработке протеиназой К и др.

Второй подраздел посвящен идентификации нового семейства нуклеаз, специфически расщепляющих дц ДНК, и его структурно-функциональной характеристике. В процессе работы над диссертацией были клонированы несколько новых последовательностей ДНК нуклеаз из ракообразных, а также был проанализирован целый ряд последовательностей ДНК – гомологов нуклеаз из доступных баз данных.

Автором был проведен биоинформатический анализ, осуществлено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей гомологов Par_DSN и построено филогенетическое древо максимального правдоподобия. Было продемонстрировано, что гомологи дуплекс-специфической нуклеазы камчатского краба имеют ряд общих характерных черт, что позволило автору диссертации выделить их в отдельное семейство. На основе делеционного и сайт-направленного мутагенеза Par_DSN были выявлены ключевые для термостабильности и энзиматической активности аминокислоты, характерные для нового нуклеазного семейства.

Третий подраздел главы «Результаты и обсуждение» включает описание разработанных автором технологий работы с нуклеиновыми кислотами с использованием Par_DSN. Уникальные свойства дуплекс-специфической нуклеазы легли в основу предложенных автором технологий

анализа сложных геномов: анализа мутаций и выявления ДНК-мишеней в сложных смесях нуклеиновых кислот, нормализации образцов геномной ДНК и транскриптома, деплеции кДНК и т.д. Важно отметить, что разработанные соискателем технологии нашли широкое использование во многих лабораториях мира.

Выводы диссертационной работы Шагина Д.А. логично следуют из поставленных цели и задач исследования. Автореферат соответствует установленным требованиям и полностью отражает основное содержание работы.

Общая оценка диссертационной работы Шагина Д.А. высокая. Тем не менее есть замечание и вопросы по результатам работы:

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.

Указанные замечания не носят принципиального характера и не снижают высокой научной ценности диссертационной работы.

Данные исследований Шагина Д.А. были доложены и обсуждены на восьми конференциях и использованы в создании учебных курсов. По результатам исследований опубликована 21 работа, включая 15 исследовательских и одну обзорную статью в рецензируемых журналах, включенных в международные базы данных, три главы в книгах международных издательств. Кроме того, получены два патента на изобретения США.

В диссертации Шагина Д.А. соблюдены требования, установленные п.14 (об отсутствии заимствований без ссылок на источник и авторов) "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842).

Тема и содержание диссертации соответствуют специальности 1.5.3. Молекулярная биология и отрасли науки – биологические науки, а ее автор Шагин Дмитрий Алексеевич заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Результаты работы могут быть использованы в молекулярно-биологических исследованиях, которые проводятся в ряде институтов Министерства здравоохранения РФ, а также в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте белка Российской академии наук, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии Российской академии наук, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии и генетики СО Российской академии наук, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной и клеточной биологии СО Российской академии наук и др.

Кроме того, полученные данные могут быть использованы при составлении курсов лекций по молекулярной биологии и биотехнологии.

Заключение. Суммируя вышесказанное, можно сделать заключение, что диссертационная работа Шагина Дмитрия Алексеевича «Термостабильная дезоксирибонуклеаза из *Paralithodes camtschaticus* – новый инструмент исследования сложных геномов» является масштабным и комплексным исследованием, в результате которого разработаны теоретические положения и технологии, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное достижение в области изучения и анализа сложных смесей нуклеиновых кислот

Необходимо отметить, что полученные в результате работы являются технологическим прорывом и формируют мировой уровень медицины и исследований в биологии. Диссертационная работа Шагина Д.А. «Термостабильная дезоксирибонуклеаза из *Paralithodes camtschaticus* – новый инструмент исследования сложных геномов» представляет собой масштабное, комплексное исследование. По содержанию, актуальности, новизне, научному и методическому уровню, практической и теоретической значимости полученных результатов, она полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842, представляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор, Шагин Дмитрий Алексеевич заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 Молекулярная биология.

Отзыв заслушан и утвержден на заседании межлабораторного семинара Федерального государственного бюджетного учреждения Института биологии гена Российской академии наук (протокол № 1 от 29 февраля 2024 года).

Ведущий научный сотрудник
Лаборатории пространственной организации генома
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт
биологии гена Российской академии наук
доктор биологических наук,
Гаврилов Алексей Александрович

Адрес: 119334, город Москва, улица Вавилова, дом 34/5

Эл. адрес: aleksey.a.gavrilov@gmail.com

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт биологии гена Российской академии наук

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

E-mail: info@genebiology.ru

Веб-сайт: <http://www.genebiology.ru>

Телефон: +7 (499) 135-60-89



ПОДПИСЬ

ЗАВЕРЯЮ

Ученый секретарь ИБГ РАН Набирочкина Е.Н.