

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию 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.

Нуклеазы играют важную роль в процессах, происходящих в живых организмах. Не менее значимым является практическое использование нуклеаз в биотехнологии и биомедицине. По этой причине поиск и изучение нуклеаз, обладающих новыми свойствами, представляет собой важную научную и практическую задачу.

Представленная к защите диссертационная работа Шагина Д.А. посвящена изучению термостабильной дуплекс-специфической нуклеазы. В рамках исследования была клонирована полноразмерная кодирующая последовательность нового фермента из гепатопанкреаса камчатского краба (*Par_DSN*), демонстрирующего уникальную комбинацию свойств, включающих термостабильность, высокую оптимальную температуру катализа, способность гидролизовать только ДНК в составе ДНК-ДНК и ДНК-РНК дуплексов. В работе был идентифицирован ряд не описанных ранее нуклеаз – гомологов *Par_DSN* из других членистоногих и впервые охарактеризовано новое семейство дуплекс-специфических нуклеаз. Были предложены новые высокоэффективные технологии для выявления однонуклеотидных различий в молекулах ДНК, идентификации целевых молекул ДНК и РНК в биологических образцах, нормализации кДНК и геномной ДНК, деплеции нецелевых последовательностей в кДНК и ДНК.

Диссертационная работа Шагина Д.А. изложена на 342 страницах, включает 78 рисунков, 32 таблицы и 669 работ в списке литературы. Диссертация построена классическим образом: введение, обзор литературы,

материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы.

Во введении дано обоснование актуальности диссертационной работы, сформулирована цель, научная новизна и практическая значимость полученных результатов, приведены основные научные результаты, выносимые на защиту.

В обзоре литературы подробно излагаются характеристики известных суперсемейств и семейств нуклеаз, механизмы катализа нуклеаз, их субстратная специфичность и т.д. Кроме того, автор детально рассматривает ряд технологий, используемых при анализе нуклеиновых кислот. Литературный обзор диссертации Шагина Д.А. сам по себе является качественным теоретическим исследованием, безусловно, способствующим введению в тему, разрабатываемую автором в своей научной работе.

Глава «Материалы и методы» производит благоприятное впечатление и будет полезна для воспроизведения результатов другими исследователями. Вызывает уважение и широкий арсенал подходов, применяемых автором в данной работе.

В главе «Результаты и обсуждение» подробно представлены этапы исследования от идеи клонирования дуплекс-специфической нуклеазы из камчатского краба до разработки технологий анализа нуклеиновых кислот с использованием Par_DSN. Важно отметить, что Шагин Д.А. не останавливается на изолировании нового активного фермента, описании его уникальных свойств и разработке оригинальных методов с его использованием, что, по сути, могло бы стать законченной работой. Автор диссертации проводит детальный анализ Serratia-подобных (SNF) последовательностей нуклеаз и идентифицированных им гомологов Par_DSN, определяет общие характерные для новой группы нуклеаз черты и постулирует открытие нового семейства дуплекс-специфических нуклеаз. Кроме того, с помощью анализа активности укороченных и мутантных форм нуклеазы краба автор определяет границы нуклеазного домена,

каталитический центр, а также область, ответственную за субстратную специфичность и стабильность нуклеаз нового семейства. Интересна идея автора о дивергентном расхождении дуплекс-специфических нуклеаз и нуклеаз семейства SNF, и тезис, что нуклеазы с двухцепочечной ДНКазной активностью могут быть найдены у других членистоногих, что было в дальнейшем подтверждено рядом работ независимых лабораторий.

Особо хочется отметить оригинальность разработанных автором технологий анализа сложных смесей ДНК и использование этих методов при изучении болевой чувствительности (в рамках международного научного консорциума по исследованию хронической боли); в исследовании рака молочной железы (в рамках международной программы по исследованию рака молочной железы); а также выявлению маркеров старения в сотрудничестве с группой лабораторий Германии (в рамках проекта по изучению механизмов старения).

Достоверность результатов и обоснованность выводов диссертационной работы Шагина Д.А. подтверждается как экспериментальными данными диссертации, так и представлением результатов работы на российских и международных конференциях, а также высоким уровнем публикаций по теме диссертации. Кроме того, результаты диссертационной работы легли в основу создания целого ряда учебных курсов для ВУЗов. По результатам исследования была опубликована 21 работа, включая главы в книгах международных издательствах, получены два патента США, разработаны коммерческие наборы реагентов.

По работе имеются ряд замечаний, комментариев и вопросов, которые, впрочем, не снижают общее положительное впечатление от диссертации:

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 Par_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.

Приведенные выше замечания и вопросы не носят принципиального характера и не снижают высокую оценку диссертационной работы. Исследование Шагина Д.А. выполнено на отличном методическом уровне, содержит предложенный автором ряд оригинальных экспериментальных и биоинформатических подходов, результаты сопровождаются необходимыми иллюстрациями и схемами. Содержание диссертации в полной мере соответствует специальности 1.5.3 – молекулярная биология. Автореферат полностью отражает основное содержание диссертационной работы. По результатам работы сформулированы пять выводов. Выводы четкие, конкретные, в полной мере отражают основные результаты работы, показывают новизну и значимость диссертационного исследования.

Таким образом, представленная на рассмотрение диссертационная работа Шагина Дмитрия Алексеевича на тему «Термостабильная

дезоксирибонуклеаза из *Paralithodes camtschaticus* – новый инструмент исследования сложных геномов», по своей актуальности, научной новизне и практической значимости, полноте описания и достоверности полученных результатов соответствует всем требованиям, включая п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утверждённого 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; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690), а ее автор Шагин Дмитрий Алексеевич заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

«26» февраля 2024 г.

Официальный оппонент:

Старший научный сотрудник Лаборатории биологических микрочипов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук, доктор биологических наук
Михайлович Владимир Михайлович



Адрес: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

Тел.: +7 (499) 135-23-11.

Email: v.mikhailovich@gmail.com

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук,

Адрес: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

Email: info@eimb.ru

Веб-сайт: www.eimb.ru

Тел.: +7 (499) 135-23-11.

Подпись В.А. Михайловича
Ученый секретарь и пр.
Бочаров А.А.

