

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Шагина Дмитрия Алексеевича на тему «Термостабильная дезоксирибонуклеаза из *Paralithodes camtshaticus* – новый инструмент исследования сложных геномов», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Нуклеазы, наряду с другими ферментами нуклеинового обмена – один из основных инструментов генной инженерии. Значение нуклеаз для биологии сложно переоценить. Каждая новая открытая и описанная нуклеаза – это не только ценная фундаментальная научная информация, но и фермент, нашедший практическое применение в биотехнологии или молекулярной биологии. Между Нобелевскими премиями за открытие рестрикционных ферментов в 1978 году и разработку методов редактирования геномов в 2020 году прошло менее пятидесяти лет, что иллюстрирует колоссальный прорыв в открытии и использовании подобных ферментов.

В этом смысле, диссертационная работа Шагина Д.А. как раз сочетает в себе как открытие и изучение нового уникального по своим свойствам фермента – дуплекс-специфической нуклеазы из гепатопанкреаса камчатского краба (Par\_DSN), так и практическое его применение в новых молекулярных технологиях анализа ДНК и РНК, безусловно, является актуальным и востребованным.

Диссертационная работа Шагина Д.А. построена традиционным образом и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы.

Диссертацию предваряет глава «**Введение**», в которой автор коротко подчеркивает актуальность и необходимость проведения настоящего исследования, обобщает основные результаты работ других исследователей,



ставит цели и задачи предстоящей работы, указывает основные положения, выдвигаемые на защиту, подчеркивает актуальность и научно-практическую значимость исследования. Кроме того, во введении приводятся данные о научных докладах автора на специализированных конференциях.

**Обзор литературы** содержит сведения для понимания целей и задач исследования. В обзоре подробно изложена информация о классификации, свойствах, механизмах действия нуклеаз, а также детально разобраны технологические подходы и методы анализа нуклеиновых кислот, требующие выделения одноцепочечной ДНК, а также методы выявления мутаций в ДНК. Хотя объем обзора литературы вырос за счет подробного описания существующих нуклеаз, это, на мой взгляд является достоинством работы.

Прочтение обзора литературы, опирающегося на самые свежие экспериментальные и теоретические работы, критическое отношение автора к результатам ученых, работающих в этой области, указывает на его высокую научную эрудицию и прекрасное знание литературы по теме диссертации. Кроме того, литературный обзор написан хорошим языком, четко структурирован и хорошо иллюстрирован.

Успешное решение поставленных Шагиным Д.А. задач во многом обусловлено применением широкого спектра современных методов молекулярной биологии и биохимии. Это позволяет высоко оценить научно-методический уровень выполненной работы и достоверность полученных автором результатов, свидетельствует о прекрасной методической подготовке автора. Раздел **«Материалы и методы»** диссертации содержит методики как выделения и изучения свойств дуплекс-специфической нуклеазы из камчатского краба, сайт-направленного и делеционного мутагена фермента, так и всех, предложенных автором технологий, разработанных на основе Par\_DSN. Достоверность полученных результатов и разработанных автором методов подтверждалась диссертантом



использованием независимыми физико-химических методов (масс-спектрометрическим анализом, секвенированием, рестрикционным анализом и т.д.).

В главе «**Результаты и обсуждение**» подробно изложены все этапы работы: от клонирования, выделения и очистки нуклеазы краба, анализа свойств фермента, выявления нового семейства Par\_DSN-подобных нуклеаз, исследования структуры, обуславливающей уникальные свойства Par\_DSN, до разработки и практического использования новых технологий на основе нуклеазы камчатского краба. В частности, в работе предложена и апробирована технология полноразмерной кДНК нормализации, являющаяся на сегодняшний день наиболее оптимальной среди предлагаемых методов нормализации.

**Научная и практическая значимость** диссертационной работы не вызывает сомнений. Клонирование и характеристика уникального фермента, специфически разрушающего двухцепочечную ДНК, при его индифферентности к одноцепочечной ДНК, клонирование новых нуклеаз из ракообразных, открытие нового семейства нуклеаз, разработка и успешное применение целого ряда новых технологий по анализу сложных геномов с использованием Par\_DSN, создание коммерческих наборов, нашедших широкое применение в решении молекулярно-биологических исследовательских задач, все это, безусловно, свидетельствует о теоретической и практической значимости диссертации.

По материалам диссертационной работы Шагина Д.А. опубликовано 16 статей (в том числе один обзор) в международных рецензируемых научных изданиях, индексируемых международными базами данных Web of Science и Scopus и рекомендованных ВАК РФ для публикации результатов научно-квалификационных работ; опубликованы три главы в книгах международных издательств, получены два патента на изобретение. Результаты работы были доложены и обсуждены на восьми конференциях, и использованы в создании



учебных курсов. Представленные публикации и тезисы докладов на конференциях позволяют сделать вывод о том, что результаты работы знакомы научной общественности.

Автореферат полностью отражает основное содержание диссертационной работы. Достоверность и актуальность выдвинутых положений, выводов не вызывает сомнения.

По диссертационной работе имеется ряд замечаний, вопросов и предложений, которые не снижают положительное впечатление от исследования:

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.

Однако высказанные замечания не меняют общего превосходного впечатления о выполненной работе и ее высокой научной ценности.

**Заключение по диссертационной работе.** Резюмируя, можно утверждать, что диссертационная работа Шагина Д.А. представляет собой оригинальное научное исследование в области молекулярной биологии по идентификации уникального фермента – дуплекс-специфической нуклеазы, выявлению нового семейства Par\_DSN-подобных нуклеаз, разработке оригинальных технологий с использованием Par\_DSN. Диссертантом успешно решена важная практическая задача – подготовка сложных образцов ДНК к масштабному секвенированию, а также к функциональному скринингу библиотек путем обогащения образца редкими транскриптам, удалению из образца заданных последовательностей, или обеднения образца по высокоповторяющимся последовательностям.

Результаты исследований, безусловно, представляют интерес для исследователей, работающих в областях геномики, транскриптомики, генетики и протеомики.

Таким образом, диссертационная работа Шагина Дмитрия Алексеевича на тему «Термостабильная дезоксирибонуклеаза из *Paralithodes camtschaticus* – новый инструмент исследования сложных геномов», представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология удовлетворяет всем требованиям (в том числе п.9), предъявляемым к докторским диссертациям «Положения о присуждении ученых 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; 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.

Официальный оппонент:

заместитель генерального директора  
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина ФМБА России  
по научной работе,  
заведующий лабораторией геномной инженерии  
ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина ФМБА России  
доктор биологических наук  
Лазарев Василий Николаевич

Подпись Лазарева В.Н. заверяю:  
Ученый секретарь ФГБУ  
ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина ФМБА России  
кандидат биологических наук



/Е.С.Кострюкова/

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина ФМБА России  
119435, г.Москва, ул.Малая Пироговская, д.1а  
телефон: +7(916) 635-24-55  
адрес электронной почты: lazarev@rcrcm.ru

11.03.2024