

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.

Анализ генетической информации является центральной составляющей при изучении биологического объекта. Мощный технологический аппарат, созданный для решения этой задачи требует использования целого спектра специфических ферментов, как на этапе подготовки образца, так и в процессе секвенирования. К таким ферментам, безусловно, можно отнести нуклеазы, которые активно применяются исследователями для работы с нуклеиновыми кислотами. Хотя на момент начала работы Шагина Д.А. было показано, что некоторые нуклеазы обладают предпочтительностью к двухцепочечной ДНК по сравнению с одноцепочечной, эти ферменты не отличались термостабильностью и не обладали достаточной избирательностью к двухцепочечной ДНК, что серьезно ограничивало их использование при работе со сложными смесями нуклеиновых кислот. Отсутствие термостабильных ферментов, способных удалять двухцепочечную ДНК, оставляя интактными одноцепочечные молекулы, что потенциально являлось ключевым в методах нормализации или деплеции, заставляло исследователей тратить большие количества ценного биологического материала и использовать многостадийные трудоемкие операции. Как правило, это было очень неудобным, затратным, и не гарантировало экспериментатору воспроизводимый результат.

Целью настоящей работы Шагина Д.А. и стало выявление, выделение и характеристика термостабильной нуклеазы, обладающей субстратной специфичностью к двухцепочечной ДНК; и разработка с использованием этой нуклеазы технологий анализа сложных смесей нуклеиновых кислот.

Диссертационная работа Шагина Д.А. построена традиционным образом. Она состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, а также списка использованной литературы. Список литературы включает 669 работ. Диссертация изложена на 342 страницах машинописного текста, включает 32 таблицы, 78 рисунков.

Диссертация Шагина Д.А. это интересная логически завершенная работа, представляющая собой ряд последовательных исследовательских шагов, обусловленных определенными вызовами и проблемами. Упрощенно логику данного исследования можно представить, как «проблема (вызов) – решение», и так несколько этапов на протяжении всей диссертационной работы. Так, например, условный первый этап связан с практическим вызовом, обусловленным отсутствием на момент начала работы среди известных ферментов нуклеазы преимущественно разрушающей двухцепочечную ДНК. Поскольку такого рода фермент был востребован для решения большого ряда практических задач при работе с нуклеиновыми кислотами, автор эту проблему решает с помощью, разработанной им же технологии «Step-Out RACE», клонированием кДНК нуклеазы краба. Следующий этап – проблема невозможности получения активного рекомбинантного белка решается с помощью оригинальной комбинации из нескольких последовательных стадий хроматографической очистки коммерчески доступного ацетонового порошка из камчатского краба. Проблема неясности механизмов термостабильности и уникальной специфичности Par_DSN приводит к клонированию полноразмерных кДНК еще нескольких нуклеаз ракообразных с последующим сравнением и анализом первичной структуры новых и доступных в базах данных нуклеаз, что завершается открытием семейства Par_DSN – подобных нуклеаз. А делеционный и сайт-направленный мутагенез нуклеазы краба позволяет выявить ключевые аминокислотные позиции, ответственные за уникальные свойства фермента. И наконец, вызов, связанный с отсутствием на момент

начала диссертационной работы эффективных, легко воспроизводимых технологий нормализации полноразмерной кДНК, нормализации геномной ДНК, деплеции ДНК и т.д. приводит автора диссертации к созданию методов, снимающих с повестки дня эти проблемы.

Важно подчеркнуть, что на основании результатов диссертационной работы при участии автора диссертации российской компанией созданы наборы реактивов: «Duplex-specific nuclease», cat.# EA001; EA002; EA003; EA008 (Evrogen), «Trimmer-2 cDNA normalization kit», cat.# NK003 (Evrogen), которые нашли широкое применение как в России, так и за рубежом.

Стоит отметить погруженность автора в молекулярно-технологическую тематику и тонкое чувство уникальных возможностей открытого им фермента и способов его применения.

Так как данные диссертационной работы легли в основу ряда коммерчески доступных продуктов, это привело к широкому внедрению полученных в исследовании результатов в мировую лабораторную практику. Нормализация с использованием Par_DSN стала методом выбора при подготовке биологических образцов для высокопроизводительного секвенирования. На основе уникальных свойств Par_DSN и разработанных автором диссертации технологий рядом западных лабораторий были предложены новые методы анализа микро РНК.

По результатам исследования Шагина Д.А. опубликована 21 работа, включая 15 исследовательских и одну обзорную статью в рецензируемых журналах, представленных в международных базах данных, а также три главы в книгах международных издательств. Получено два патента на изобретения США.

Результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях, а также использованы при разработке учебных курсов для студентов ведущих российских вузов. Представленные публикации и тезисы докладов на конференциях, а также результаты исследований свидетельствуют о том, что результаты работы

знакомы научной общественности. В настоящее время число статей, упоминающих дуплекс-специфическую нуклеазу камчатского краба, в базе данных Google Scholar превышает 2000.

Не смотря на прекрасное впечатление, которое производит диссертационная работа Шагина Д.А., хотелось бы высказать автору ряд замечаний и задать ряд вопросов.

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?

Отмечу, что вопросы и замечания, приведенные выше, никоим образом не уменьшают важности и значимости исследования Шагина Д.А.

Подводя итог всему выше сказанному, с уверенностью можно утверждать, что диссертация Шагина Д.А. представляет собой качественное законченное исследование, осуществленное на высоком уровне, и объединяющее в себе широкий спектр исследовательских направлений и различных методических подходов.

Помимо открытия и описания нового уникального фермента, открытия нового семейства нуклеаз, автору удалось решить важную проблему – трансляции научных изысканий в практическую сферу. Разработанные автором на основе уникальных свойств нуклеазы краба молекулярные технологии прекрасно встроились в палитру методов молекулярной биологии, став значимыми инструментами исследовательской деятельности.

Автореферат написан в хорошем литературном стиле и полностью отражает основное содержание диссертационной работы Шагина Д.А. Выводы из работы обоснованы.

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, включая п.9, установленным «Положением 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:

Научный руководитель
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Академик РАН
д.б.н., проф. Николай Казимирович Янковский

Адрес: 119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, д. 3
Email: iogen@vigg.ru
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Тел.: (499) 135-62-13.
Факс: (499) 132-89-62

21.02.2017
УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
Д. Б.
ГОРЯЧЕВА

