

О Т З Ы В

на автореферат докторской диссертации Летарова Андрея Викторовича на тему:
«Эволюционная динамика белков адсорбционного аппарата некоторых групп бактериофагов», представленной в диссертационный совет Д 501.001.76 при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Согласованное исследование экологической динамики популяций колифагов и других бактериофагов в их естественной среде и молекулярных событий, отражающих их микроэволюцию *in situ* может служить кратчайшим путём к пониманию как особенностей экологии соответствующих природных систем, так и молекулярных основ адаптации вирусов прокариот. Целью работы в связи с этим явилось исследование процессов микроэволюции белков адсорбционного аппарата различных групп колифагов в природной среде.

Впервые установлена способность С-терминального домена (фолдона) фибритина фага Т4 к автономной тримеризации, показана его роль в инициации фолдинга этой молекулы. Впервые показано, что кишечное микробное сообщество лошадей включает преимущественно вирулентные колифаги в качестве своего автохтонного компонента. Предложен новый высокоразрешающий метод геномного ПЦР-фингерпринтинга колиформных бактерий, позволяющий дифференцировать близкородственные изоляты, обладающие разной чувствительностью к фагам. Впервые охарактеризованы перестройки геномов и генов белков адсорбционных аппаратов у близких изолятов кишечных колифагов, полученных из одного источника.

В результате проведенных исследований определен новый подход к интерпретации данных об эволюционной пластичности белков с учётом сохранения пути фолдинга. Полученные в работе данные свидетельствуют о значительном различии стратегий эволюции генома у различных групп бактериофагов и о существовании различных стратегий адаптации адсорбционных аппаратов. Выявленные особенности эволюции геномов целесообразно также учитывать при разработке систем молекулярного экспресс-типирования фагов, включаемых в

терапевтические смеси, а также при интерпретации данных такого типирования. Полученные в работе данные об особенностях экологических взаимоотношений бактериофагов и их хозяев в микробной системе кишечника лошади определили как удобную модельную систему природного микробного сообщества, так и новую методологию исследования взаимодействия фаговых и бактериальных популяций с разрешением на уровне штаммов. Разработанные в ходе исследований системы высокоразрешающего ПЦР-фингерпринтинга колиформных бактерий могут применяться в различных областях микробиологии и медицины.

Основное содержание работы отражено в 23 печатных работах (14 экспериментальных статьи, 4 обзора в рецензируемых журналах из перечня ВАК РФ, 2 главы в монографиях, 3 статьи в сборниках материалов конференций).

Считаем, что диссертационные исследования А.В. Летарова соответствуют требованиям ВАК, предъявляемые к докторским диссертациям, а ее автор, Андрей Викторович Летаров, заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальностям: 03.02.02 – вирусология, 03.01.03 – молекулярная биология.

д.б.н., профессор, зав. кафедрой микробиологии,
вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО
«Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

 /Д.А. Васильев /

д.б.н., профессор, профессор кафедры микробиологии,
вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВПО
«Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

 /С.Н. Золотухин/



Подпись *Васильева Д.А., Золотухина С.Н.*

заверяю: начальник отдела
кадров академии

А.А. Овчинников 20/14 г.

 Т.В. Шевалдова

Отзыв на автореферат диссертационной работы А.В. Летарова «Эволюционная динамика белков адсорбционного аппарата некоторых групп бактериофагов», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук.

ONS KENMERK
UW KENMERK
LEUVEN

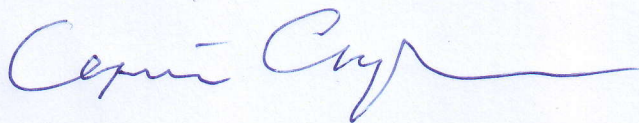
Я с большим удовольствием прочитал автореферат диссертации Андрея Летарова. Исследования бактериофагов относятся к одной из наиболее увлекательных областей современной молекулярной биологии. Глобальное значение бактериофагов как важнейшего компонента Биосферы, как справедливо отмечает соискатель, не вызывает никаких сомнений. Из этого вытекает также и привлекательность бактериофагов как потенциальных антибактериальных агентов.

Диссертация Летарова есть результат тщательных, планомерных многолетних исследований, проводившихся автором в сотрудничестве с рядом отечественных и иностранных лабораторий. Результаты этих исследований были изложены в большом количестве сильных научных публикаций. Я особенно хотел подчеркнуть тот факт, что работа Летарова является хорошим примером современного многопланового проекта с использованием целого ряда подходов, относящихся к очень разным областям.

Так, часть диссертации, посвященная исследованию свойств фибритинов, потребовала применения разнообразных методов современной молекулярной и структурной биологии. Хочется отметить в особенности, что фолдон фибритина бактериофага Т4, в изучение которого соискатель внес существенный вклад, оказался столь интересным объектом, что впоследствии несколько иностранных групп (А. Mitraki, Греция; Т. Kiefhaber & S. Grzesiek, Швейцария, и др.) продолжили его исследование.

Часть работы, посвященная бактериофагам бактериального сообщества кишечника лошади, также заслуживает всяческих похвал. Автору удалось спланировать и реализовать весьма оригинальную программу исследований и сделать массу интересных выводов. При этом был использован широкий спектр методов, от чисто микробиологических до молекулярно-генетических и современных биоинформатических подходов.

Полученные очень значительные результаты понятно и логично изложены в автореферате. Я поздравляю А.В. Летарова с замечательной работой. По моему убеждению, он достоин присуждения ученой степени доктора биологических наук.



С.В. Стрелков, к.ф.-м.н, профессор, заведующий Лабораторией биокристаллографии
Лёвенского Католического Университета, Бельгия

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Летарова Андрея Викторовича
«Эволюционная динамика белков адсорбционного аппарата некоторых групп
бактериофагов» представленной на соискание ученой степени доктора
биологических наук по специальностям 03.02.02 – вирусология, 03.01.03 -
молекулярная биология

Исследования в области биологии бактериофагов, особенно обитателей человека и животных, актуальны и имеют большое практическое значение в связи с возможностью их применения в антибактериальной терапии, на что возлагают большие надежды в связи с растущей антибиотикорезистентностью патогенных микробов. Симбиотические сообщества, сформированные микрофлорой кишечника различных животных, являются одним из главных мест обитания *Escherichia coli* и ее фагов – колифагов. Несмотря на внушительный объем знаний о молекулярных механизмах формирования фаговой инфекции и адаптации этих вирусов, остается множество нерешенных вопросов, касающихся процессов микроэволюции колифагов в их природной среде обитания. Согласованное исследование экологической динамики популяции колифагов и других бактериофагов в их естественной среде и анализ молекулярных событий, отражающих их микроэволюцию, могло бы помочь в понимании особенностей экологии соответствующих природных систем и молекулярных основ адаптации вирусов прокариот. В этой связи своевременным выглядит диссертационная работа Летарова А.В., посвященная исследованию процессов микроэволюции белков адсорбционного аппарата различных групп колифагов в природной среде.

Автореферат диссертации построен по классической схеме и по оформлению соответствует общепринятому стандарту. Цель и задачи исследования адекватно сформулированы и логично связаны между собой. В разделах «новизна исследования» и «научно-практическая ценность»

акцентируется внимание на наиболее существенных достижениях представляемого к защите исследования. В частности, хочется отметить впервые установленную роль С-терминального домена (фолдона) фибритина фага Т4 в инициации фолдинга этого белка, способного к автономной тримеризации, а также описание основных закономерностей эволюции Т-чётных фагов на основании данных геномного секвенирования.

С точки зрения изучения колифагов в природной среде обитания, интересным выглядит наблюдение, что кишечное микробное сообщество лошадей включает преимущественно вирулентные колифаги в качестве своего автохтонного компонента. При этом показано, что уровень внутривидового разнообразия колиформных бактерий, существующий в этих экосистемах, достигает сотен одновременно присутствующих штаммов, значительно различающихся по чувствительности к присутствующим одновременно с ними колифагам. Наблюдаемый при этом полиморфизм белков адсорбционного аппарата у близкородственных экологически связанных изолятов индигенных колифагов лошадей свидетельствуют об активной селекции новых вариантов спектра хозяев у этих вирусов.

Представленный автореферат диссертации дает исчерпывающее представление о спектре примененных в работе методов и результатах, полученных в ходе проведенных экспериментов.

Большой объем экспериментальных данных относится к исследованию фибритина фага Т4 и его гомологов. Автором глубоко исследована структура этого белка, функциональные особенности его доменов, варианты фолдинга. Кроме того, исследована вариабельность фибритина в различных филогенетических группах. Интересные данные представлены о внутривидовой вариабельности штаммов *E. coli* в составе микробного сообщества кишечника лошадей.

Большой объем экспериментальных данных, тщательно подведенная доказательная база не вызывает сомнений в достоверности полученных

результатов и обоснованности сделанных выводов. Работа выполнена на высоком методическом уровне.

Изложенные в диссертационном исследовании Летарова А.В. экспериментальные данные неоднократно обсуждались на международных научных конференциях, по материалам диссертации опубликовано 23 печатные работы - 14 экспериментальных статей и 4 обзора в журналах, рекомендуемых ВАК РФ, 2 главы в монографиях и 3 статьи в сборниках материалов конференций.

Заключение

Ознакомление с авторефератом диссертации Летарова Андрея Викторовича «Эволюционная динамика белков адсорбционного аппарата некоторых групп бактериофагов» позволяет сделать заключение, что представленная работа является самостоятельным, законченным исследованием и по актуальности, новизне полученных результатов, высокой научной и практической значимости полностью соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения учёных степеней» (Постановление правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), предъявляемым ВАК РФ к диссертационным работам на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.02 – вирусология, 03.01.03 – молекулярная биология

Заведующая лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов
ФГБУН НИИ Физико-химической медицины ФМБА России
119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а, www.niifhm.ru
Тел.: +7 499 245 04 71
e-mail: ilinaen@gmail.com

Доктор биологических наук, доцент

Ильина Е. Н.

Подпись Е.Н. Ильиной заверяю:
ученый секретарь ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России
кандидат биологических наук



Васильева Л.Л

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации **Летарова Андрея Викторовича**
**«Эволюционная динамика белков адсорбционного аппарата некоторых
групп бактериофагов»**

представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук.
по специальностям 03.02.02 – вирусология и 03.01.03 – молекулярная биология

Вирусы микроорганизмов (бактериофаги) служат модельными объектами для изучения фундаментальных микробиологических молекулярных механизмов в течение многих десятилетий. Однако многие аспекты взаимодействия «вирус-хозяин» до последнего времени оставались вне пристального внимания исследователей. Данные о процессах, сопровождающих адаптацию бактериофагов к тем или иным штаммам бактерий, очень разрознены, а теории, обобщающие закономерности адсорбции, довольно поверхностны и имеют множество «исключений из правил». Диссертация А.В. Летарова представляет собой пример накопления данных и успешного систематического анализа, делающих существенный вклад в общую картину научного понимания биологических процессов. Работа А.В. Летарова посвящена изучению молекулярной микроэволюции белков адсорбционного аппарата разных групп бактериофагов *Escherichia coli*, в том числе в природных микробиологических сообществах.

Проделанную работу можно разделить на три смысловые части: (1) Исследование модульных перестановок в строении воротничковых фибрилл (фибритинов) Т-четных бактериофагов, установление зависимости генетических изменений от общей эволюционной изменчивости этой группы вирусов; (2) Поиск природной экосистемы, в которой существует высокое разнообразие бактерий-хозяев и адаптирующихся к ним литических бактериофагов, обоснование кишечного микробного сообщества домашней лошади в качестве оптимальной экосистемы, разработка методологии дальнейших исследований, которая включала культуральные методы,

электронно-микроскопическое исследование разнообразия морфологии вирусов и геномный ПЦР-фингерпринтинг, позволяющий отслеживать близкородственные штаммы бактерий; (3) Определение и характеристику генетических перестановок в близкородственных изолятах N4-подобных и T5-подобных колифагов, приводящих к изменению спектра бактерий-хозяев.

Представленный автореферат диссертации содержит всю необходимую информацию, отражающую полученные автором результаты. Он написан логично, хорошо структурирован, содержит достаточно подробное описание хода работы и все необходимые иллюстрации, что позволяет составить детальное представление о всей работе и оценить обоснованность выводов. Личный вклад автора в результаты, опубликованные в журналах и представленные на конференциях, весьма велик и включал в себя как трудоемкие эксперименты, требующие высокой квалификации, так и стратегическую организацию исследовательских проектов. Можно заключить, что диссертационная работа Андрея Викторовича Летарова содержит все необходимые признаки докторской диссертации.

В качестве замечаний следует отметить достаточно слабую логическую связь между отдельными частями диссертационной работы, и излишне подробное описание экспериментов, не относящихся к основной канве работы (например, was-опосредованные конформационные переходы длинных хвостовых фибрилл T-четных фагов). Однако эти замечания касаются не научной ценности работы, а композиционного строения диссертации. Вероятно, отмеченные недостатки являются следствием не совсем удачного сокращения текста при написании автореферата диссертации.

В целом работа вносит существенный вклад в изучение молекулярных механизмов эволюционных изменений в адсорбционных аппаратах бактериофагов *E.coli* и хвостатых вирусов в целом. По новизне полученных результатов и их научной значимости диссертационная работа А.В. Летарова соответствует требованиям п. 7 и 8 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор достоин присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.02.02 – вирусология и 03.01.03 – молекулярная биология.

Заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова РАН,

д.х.н.

К.А. Мирошников

Подпись К.А. Мирошникова заверяю:

Ученый секретарь ИБХ РАН

д.ф.-м.н.,



В.А. Олейников

25.09.2014

В Совет Д 501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования “Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова”

Отзыв на автореферат диссертации
Летарова Андрея Викторовича
на соскание учёной степени доктора биологических наук
по специальностям 03.02.02 – вирусология, 03.01.03 – молекулярная биология.

Представленная работа озаглавлена “Эволюционная динамика белков адсорпционного аппарата некоторых групп бактериофагов” и содержит 43 страницы, включая 12 иллюстраций и ссылки на 18 печатных работ автора по теме диссертации, опубликованных в рекомендуемых ВАК журналах, и пять работ, опубликованных в других печатных изданиях.

Изучение вирусов бактерий – бактериофагов, имеет долгую историю, привело к массе открытий, и позволило понять механизмы многих биологических процессов. Сегодня бактериофаги остаются важным объектом исследований, особенно в связи с ростом резистенции многих патогенных бактерий к синтетическим антибиотикам. Изучение и применение (уже идущее, и набирающее силу) бактериофагов в медицинских целях является, таким образом, важным инструментом современной медицинской науки. Помимо практики, бактериофаги с их высокой скоростью мутаций позволяют изучать процессы эволюции и адаптации в сложных системах, включающих вирусы, бактерии, и их хозяйские организмы.

В данной работе автор представил комплексный подход: начав с изучения полиморфизма адсорпционного аппарата колифагов различных групп, он перешёл к исследованию взаимодействия с их мишенями в хозяйских клетках, механизмов их взаимного влияния с эволюционной точки зрения, с последующим распространением полученных результатов с этих модельных систем на наблюдаемые реальные микробные системы в организме лошади.

Исследования воротничковых нитей (фибрина) бактериофага T4 позволили установить их морфологию, выделить участки, ответственные за начальную сборку и тримеризацию этих молекул в биологически активную форму, их взаимодействия с другими компонентами вирусных частиц. Эти структурные исследования вкупе с геномными позволили охарактеризовать основные закономерности эволюции геномов T-четных бактериофагов, и перенести их на другие родственные группы.

Исследование микробной экосистемы кишечника лошади позволило проследить эволюционное взаимодействие между бактериальной и фаговой компонентами, с отмеченным селективным давлением популяций вирулентных колифагов на популяции бактерий. Было показано чрезвычайно высокое разнообразие одновременно присутствующих генетически различных штаммов *E. coli* и колиформных бактерий, демонстрирующих различные уровни чувствительности к присутствующим колифагам. Этот баланс бактерий и фагов зависит от внешних условий, и может быть учтён при диагностике заболеваний и, возможно, скорректирован в процессе лечения.

Работа написана ясным языком. Иллюстрации наглядны и помогают лучшему пониманию проведенных экспериментов и полученных результатов. Отдельные части данной работы и более общие обзоры были опубликованы в реферируемых журналах, в том числе рекомендуемых ВАК, и представлены на международных конференциях.

По моему мнению представленная работа автора соответствует уровню учёной степени доктора биологических наук.



03.10.2014

Костюченко Виктор Анатольевич, к.б.н.
(Kostyuchenko Victor, Ph.D.)
Senior Research Fellow
Program in Emerging Infectious Diseases