

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П.Чумакова»
Российской академии медицинских наук**

142782, г. Москва, поселение Московский,
поселок Института полиомиелита,
27 км. Киевского шоссе.
Телефон: (495) 841-90-07
Факс: (495) 841-93-30

E-mail: institute@poliomyelit.ru
Интернет: www.poliomyelit.ru
ОКПО 01897848
ОГРН 1025000655283
ИНН/КПП 5003003552/775101001

№

2384

«УТВЕРЖДАЮ»

И.о. директора ФГБУ

«ИШВЭ им. М.П.Чумакова» РАМН,
доктор медицинских наук, профессор

Е.А. Ткаченко

«3» октября 2014 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу А.В. Летарова на тему: «Эволюционная динамика белков адсорбционного аппарата некоторых групп бактериофагов», представленную к защите на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальностям:

03.02.02 – «вирусология» и 03.01.03 – «молекулярная биология»

Представленная на рецензию диссертационная работа А.В. Летарова посвящена актуальной проблеме: исследованию популяционной генетики бактериофагов кишечного микробиома, в частности, генетического аппарата белков адгезии бактериофагов на бактериальные клетки. Актуальность выбранной темы обусловлена, в первую очередь, многочисленностью бактериофагов, являющихся важнейшим фактором формирования и поддержания стабильности микробиома человека. В свою очередь, состав микробиома в большой мере определяет состояние здоровья человека, его индивидуальную чувствительность к большинству биогенных и абиогенных факторов.

Кроме того, фаги являются исключительно удобной моделью для разработки принципов использования в биомедицинской науке методов высокопроизводительного секвенирования, метагеномного и протеомного анализа. Появление этих методов представляет собой качественное изменение в возможностях современной биологии, можно ожидать, что в ближайшие годы именно они в значительной мере будут определять лицо всех наиболее важных открытий в нашей науке.

С учётом сказанного, необходимо отметить, что при выполнении работы диссертант умело и эффективно использовал весь арсенал наиболее современных методов биоинформатики, белковой инженерии, молекулярной биологии и микробиологии. Одновременно он показал пример творческого и результативного использования такого традиционного, но недостаточно популярного метода, как электронная микроскопия. Несомненно также, что автор на самом высоком уровне владеет методологией классических микробиологических исследований, что придает его работе характер моста между традиционными и набирающими силу тенденциями в молекулярной биологии.

Структура диссертации

Диссертационная работа построена по традиционному плану. Она состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка использованной литературы.

Работа изложена на 208 страницах машинописного текста, включает 48 рисунков и 7 таблиц, список из 294 использованных литературных источников.

Раздел «Введение» содержит обоснование актуальности исследования. Поскольку работа четко делится на две методически не связанные составные

части: исследование белков коротких фибрилл бактериофагов, родственных T4, и исследование виroma колифагов лошади, во введении приводится аргументация логической связи между частями. В частности, дается обоснование выбора в качестве объекта исследования суперсемейства фага T4, как яркого представителя литических бактериофагов: это автор аргументирует высокой представленностью в виrome кишечника человека и животных именно литических фагов, причем речь идёт как о биомассе этих фагов, так и об их биологическом разнообразии. Автор обосновывает также выбор лошади, в качестве наиболее удобной животной модели для исследования кишечных колифагов. На наш взгляд, наиболее убедительным тезисом введения, хорошо обоснованным данными литературного обзора, является утверждение о том, что без понимания механизмов эволюции генома фагов не удастся построить практически пригодную для использования, достаточно универсальную классификацию бактериофагов. Проблема обусловлена повышенной склонностью бактериофагов к рекомбинации (горизонтальному переносу генетического материала), что делает невозможным построение дихотомической номенклатуры бактериофагов на принципе К. Линнея. В то же время, альтернативных алгоритмов классификационных схем каких-либо организмов до настоящего времени не предложено. Диссертант предлагает рациональный выход из создавшегося тупика: вместе с интернациональным коллективом экспертов он обосновывает тезис о существовании коровой (высоко консервативной) части генома бактериофагов, в пределах которой может быть использован принцип «дихотомического дерева». При участии автора удалось доказать эффективность данного подхода для построения таксономии T4-подобных бактериофагов. С учётом этого логического построения становится понятным значение экспериментов в области структурно-функциональной организации гена фибритина для компоновки

диссертации, которое при беглом прочтении работы может показаться оторванным от «экологической» части работы.

Обзор литературы. В этой части, состоящей из шести разделов, автор даёт сводку наиболее существенных работ, посвященных разнообразию бактериофагов, описывает охарактеризованные механизмы эволюции бактериофагов, экологию бактериофагов. При этом диссертант опирается как на классические работы основоположников вирусологии бактериофагов, так и на самые последние работы.

Обращает на себя внимание широкий кругозор диссертанта, безусловно являющегося одним из ведущих специалистов в области бактериофагов в нашей стране. При написании обзора литературы он не только дает оценку выводам из работ всех основных научных групп, работающих в области молекулярной биологии бактериофагов, но и позволяет почувствовать дух их исследований в историческом аспекте. Это существенно облегчает оценку достоверности и степени универсальности традиционных постулатов вирусологии бактериофагов, дает дополнительные аргументы в пользу решений, принятых диссертантом при выполнении собственных экспериментов.

Обзор литературы является важной самостоятельной частью работы, в должной мере обосновывающей поставленную цель и задачи исследования.

Материалы и методы исследования. Методическая часть рецензируемой работы, как и литературный обзор, заслуживает самой положительной оценки. Она показывает, что диссертант мастерски владеет методами белковой инженерии, включающей как технику молекулярного клонирования, так и белково-химическую её часть. Из этого раздела видно, что при выполнении эксперимента было получено свыше 15 высокоэффективных продуцентов белков бактериофагов, дающих до 40% целевого продукта от общей массы

клеточного белка. Каждый такой штамм должен рассматриваться как важная победа биотехнологии, поскольку далеко не любая конструкция на базе стандартного вектора позволяет получить пригодный для использования штамм-продуцент.

Важным элементом методической части является описание метода ПЦР-типирования штаммов кишечной палочки с применением праймеров на мобильный генетический элемент IS1. Этот полностью оригинальный метод, разработанный лично диссертантом и сотрудниками его лаборатории, обладает крупными преимуществами над традиционными вариантами RAPD-ПЦР: благодаря отличной воспроизводимости и лучшему выходу продуктов он полностью совместим с методами высокопроизводительного секвенирования. Несомненно, предложенный автором принцип использования праймеров на массово встречающиеся в геноме мобильные генетические элементы может быть применен и для типирования штаммового полиморфизма большинства других бактерий.

Находкой является оригинальный метод препаративного выделения бактериофагов из фекалий центрифугированием в двухфазной системе глицерин-фреон.

Еще одной важной методической удачей автора является использование техники электронной микроскопии. Высококачественные электронные микрофотографии и грамотный подход к статистической обработке изображений являются исключительно выигрышным моментом диссертации А.В. Летарова, придающим ей законченность и целостность.

Изложение материала в главе «Материалы и методы» также вполне удачно. Оно позволяет беспрепятственно пользоваться наработками автора широкому кругу исследователей.

Раздел «Результаты и обсуждение» изложен на 89 страницах. Он включает четыре экспериментальных главы и заключение, подытоживающее значение описанных экспериментов. Раздел написан четко и убедительно, хорошо документирован.

Выводы

Выводы из работы изложены четко и лаконично. Они полностью вытекают из результатов работы и хорошо отражают их суть.

Степень представленности результатов работы в публикациях

Материалы, полученные при выполнении данной диссертационной работы, изложены в 18 публикациях, рекомендованных ВАК РФ для защиты по специальностям «вирусология» и «микробиология». Одиннадцать из них опубликованы в международных изданиях, в том числе, ведущих журналах с высокими индексами цитирования Journal of Bacteriology, Virology, Applied and Environmental Microbiology. В списке публикаций нет ни одной работы, связь которой с результатами диссертации вызывает сомнения. Таким образом, по степени представленности результатов в публикациях диссертация А.В. Летарова не только полностью соответствует требованиям ВАК РФ, но и существенно превосходит средний уровень представляемых работ.

Материалы диссертации представлялись на различных конференциях и конгрессах. Автореферат в должной мере отражает основное содержание работы.

Замечания по работе

Несмотря на высокий научный и методический уровень работы, мы считаем необходимым указать на два существенных момента, оставшихся без должного освещения.

- 1) В литературном обзоре, в частности, при обосновании выбора модели лошади для исследования бактериофагов и при описании данных электронно-микроскопического анализа их виroma диссертант упоминает, что бактерии группы кишечной палочки (семейства *Enterobacteriaceae*) далеко не всегда доминируют в микробиоме кишечника или хотя бы составляют его заметную долю. По данным последних работ, выполненных с применением технологий NGS, как минимум, в некоторых случаях они должны рассматриваться лишь как минорный компонент, который может даже полностью отсутствовать у отдельных видов животных или отдельных индивидов. Например, в работе Mitra et al, BMC Genomics, 2013 приведена характеристика микробного консорциума статистически значимой выборки пациентов с применением платформы Solid, а также с помощью выборочного секвенирования банков 16S рДНК на капиллярных секвенаторах. Представленные в работе данные свидетельствуют о том, что 80-90% бактериальных тел в толстом кишечнике человека представляют собой представителей семейства *Bacteroidaceae* (среди которого, в свою очередь, доминируют представители трех видов рода *Bacteroides*). Каждое из других пяти относительно массово представленных семейств *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, *Porphyromonadaceae*, *Eubacteriaceae*, *Clostridiaceae* занимает не более 5% каждое (результаты варьируют в зависимости от использованного метода). Семейство *Enterobacteriaceae*, часто рассматриваемое как наиболее типичное для микрофлоры ЖКТ, по этим данным составляет менее 10⁻⁴% от общей массы бактерий кишечника. Аналогичные данные имеются и в других опубликованных

работах последних лет (Qin et al, 2010; Degnan and Ochman, 2012). То обстоятельство, что это семейство до настоящего времени находится в центре внимания специалистов различного профиля, во многом обусловлено лишь хорошей культивируемостью энтеробактерий на искусственных питательных средах. Автору следовало бы акцентироваться на этом моменте при выборе лошади в качестве модели для исследования, сопоставив ее с человеком и наиболее исследованными видами животных. Логическим упущением, вытекающим из недоучета возможной малой представленности энтеробактерий в кишечнике, является игнорирование первоочередной необходимости адаптации энтеробактерий к конкурентному давлению со стороны массовых видов кишечного микробиома. Это же замечание может касаться и колифагов. Это обстоятельство также чрезвычайно важно при сопоставлении данных электронной микроскопии с данными выделения колифагов культуральными методами. Не исключено, что при условии малой представленности энтеробактерий наблюдаемые двумя методами группировки бактериофагов могут пересекаться лишь в незначительной мере. Целесообразно было бы выполнить экспериментальную оценку доли энтеробактерий (или *E. coli*) в кишечнике исследовавшихся лошадей (вероятно, с применением ПЦР в реальном времени), а также предложить методы препаративного отделения колифагов от прочих бактериофагов или хотя бы оценки их доли в общем пуле частиц. Делая акцент на исследованиях колифагов, диссертанту следовало бы уделить больше внимания этому вопросу во введении и, возможно, даже отразить его в названии работы. Непонятным осталось, с какой целью при изоляции штаммов энтеробактерий из фекалий лошади в среду добавляли 0,01% додецилсульфата натрия (стр. 81). По нашим наблюдениям большая

часть лабораторных штаммов *E. coli* не способна расти при такой концентрации детергента, таким образом, по не вполне ясному принципу отбрасывалась часть штаммов энтеробактерий.

- 2) Поскольку из результатов работы следует, что не существует универсального штамма бактерии-хозяина, позволяющего выделять все или хотя бы большую часть колифагов из состава вирома кишечника лошади (как, вероятно, и других животных), автору следовало бы разработать метод, позволяющий оценивать общее число колифагов или фагов, родственных Т4, в составе первичного материала фекалий, и использовать его до начала экспериментов культуральными методами. Поскольку из результатов работы следует, что существуют высоко консервативные коровые элементы генома Т4-подобных бактериофагов (преимущественно, гены белков головки), то целесообразно было бы разработать наборы праймеров и зондов, позволяющие количественно оценивать содержание таких фагов в виrome кишечника методом ПЦР в реальном времени. Без использования этих или подобных по производительности методов анализа вирома едва ли могут быть получены статистически достоверные данные о динамике численности бактериофагов в кишечнике. Используемые культуральные методы чрезмерно трудоёмки для выполнения исследований с применением статистических методов. Кроме того, они позволяют наблюдать лишь за частью колифагов, составляющей неизвестную (возможно, пренебрежимо малую) долю от всего вирома.

Помимо замечаний по существу работы, необходимо указать на наличие достаточно многочисленных стилистических погрешностей. В частности, обнаружены следующие неудачные обороты:

На стр. 43 имеется оборванное предложение «Такого рода экспериментальная перегрузка»;

На стр. 44: «не детектировалось на индикаторного штамма»;

На стр. 45: «после описанных экспериментов, практически не *E. coli* в своём кишечнике»;

На стр. 80: «после чего аликвоты были центрифугировали»;

На стр. 113: «с антителами, выращенными против рекомбинантного фибритина, полученного в *E.coli*»;

На стр. 115: «полностью делетирована полипептидная цепь обрывается в пределах участка гомологии»;

На стр. 179: «Таким образом, одной из детерминант хозяйской специфичности, необходимой для роста наших фаговых изолятах по меньшей мере на некоторых штаммах хозяев.».

Высказанные замечания, безусловно, носят дискуссионный характер и не ставят под сомнение достоверность результатов диссертации и её выводов. Мы надеемся, что они будут учтены автором в дальнейшей работе.

Резюмируя сказанное, необходимо подчеркнуть, что работа выполнена на самом высоком научно-методическом уровне. Её автор, А.В. Летаров является одним из ведущих экспертов РФ в области вирусологии и молекулярной биологии бактериофагов.

Заключение.

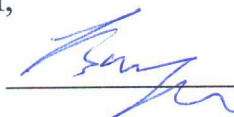
Диссертационная работа А.В. Летарова «Эволюционная динамика белков адсорбционного аппарата некоторых групп бактериофагов», представленная к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям: 03.02.02 – «вирусология» и 03.01.03 – «молекулярная биология», является законченным научно-квалификационным исследованием, а на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические

положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение.

В соответствии с вышеизложенным, диссертационная работа А.В. Летарова соответствует всем требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор Летаров Андрей Викторович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям: 03.02.02 – «вирусология» и 03.01.03 – «молекулярная биология».

Отзыв обсужден на заседании семинара лаборатории биотехнологии ФГБУ «ИПВЭ им. М.П.Чумакова» РАМН, состоявшемся 2 октября 2014 г.

Ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии,
ФГБУ «ИПВЭ им. М.П.Чумакова» РАМН,
доктор медицинских наук

 В.В.Варгин

*Получен упр. делами
и.о. упр. делами
Галактико*



3.10.2014

Сведения о ведущей организации

по диссертационной работе Летарова Андрея Викторовича по теме «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

1. Полное название организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова Российской академии медицинских наук»

2. Сокращенное название организации:

ФГБУ «ИПВЭ им.М.П.Чумакова» РАМН

3. Адрес:

142782, г. Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита, 27 км. Киевского шоссе.

4. Телефон, электронная почта:

Телефон: (495) 841-90-07

Факс: (495) 841-93-30

E-mail: institute@poliomyelit.ru

5. Адрес официального сайта:

www.poliomyelit.ru

6. Список основных публикаций работников ведущей организации по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет:

1) Agol V.I., Gmyl A.P. Viral security proteins: counteracting host defences. //Nature Reviews Microbiology. 2010. V. 8. № 12. С. 867-878.

2) Bardina M.V., Lidsky P.V., Fominykh K.V., Agol V.I., Sheval E.V., Polyakov V.Y., Van Kuppeveld F.J.M. Mengovirus-induced rearrangement of the nuclear pore complex: hijacking cellular phosphorylation machinery. //Journal of Virology. 2009. V. 83. № 7. С. 3150-3161.

3) Matrosovich M.N., Gambaryan A.S. Solid-phase assays of receptor-binding specificity. //Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). 2012. V. 865. С. 71-94.

4) McWilliam Leitch E.C., Simmonds P., Cabrerizo M., Trallero G., Cardoso J., Harvala H., Ivanova O.E., Lukashev A., Kroes A.C.M., Muir P., Odoom J., Roivainen M., Susi P., Evans D.J. Evolutionary dynamics and temporal/geographical correlates of recombination in the human enterovirus echovirus types 9, 11, and 30. //Journal of Virology. 2010. V. 84. № 18. С. 9292-9300.

5) Belalov I.S., Lukashev A.N. Causes and implications of codon usage bias in RNA viruses. //PLoS ONE. 2013. V. 8. № 2. С. e56642.

6) Drexler J.F., Corman V.M., Müller M.A., Ritz D., Kallies R., Gloza-Rausch F., Binger T., Kümmerer B.M., Drosten C., Lukashev A.N., Gmyl A., Coutard B., Adam A., Leijten L.M., van Riel D., Kuiken T., Klose S.M., Cottontail V.M., Annan A., Adu-Sarkodie Y. et al. Evidence for novel hepaciviruses in rodents. //PLoS Pathogens. 2013. V. 9. № 6. С. e1003438.

7) Боравлева Е.Ю., Ломакина Н.Ф., Кропоткина Е.А., Руднева И.А., Ямникова С.С., Руденко Л.Г., Дрыгин В.В., Гамбарян А.С. Получение и характеристика реассортантного вируса гриппа а с гемагглютинином h5 и остальными генами от апатогенного вируса h6n2. //Вопросы вирусологии. 2011. Т. 56. № 6. С. 9-14.

Сведения верны:

Ученый секретарь ФГБУ «ИПВЭ
им.М.П.Чумакова» РАМН



 Е.П. Амон