

**Отзыв официального оппонента**  
**на диссертационную работу Голомидовой Аллы Константиновны**  
**«Структурная и функциональная организация адсорбционного**  
**аппарата T5-подобных бактериофагов DT57C и DT571/2»,**  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.02.03- Микробиология

**Актуальность темы выполненной работы**

Диссертационная работа Голомидовой Аллы Константиновны посвящена актуальной проблеме: изучению устройства адсорбционного аппарата T5-подобных бактериофагов и определению стратегии распознавания ими клеток хозяев.

Актуальность работы определяется важностью понимания механизмов взаимодействия между структурами бактериофагов и поверхностью атакуемых ими бактерий. Новые знания в этой области, несомненно, имеют основополагающее фундаментальное значение с точки зрения развития представлений о коэволюции фагов и бактерий, а также о формировании устойчивых микробных экосистем. Тем не менее, практически все исследования механизмов адсорбции фагов на поверхности бактериальной клетки и узнавания клеточных рецепторов, а также блокирования этих процессов, практически всегда имеют прикладную направленность. Они являются одними из ключевых элементов, которые определяют эффективность разработок в области получения новых фаговых антибактериальных препаратов, а также штаммов промышленных микроорганизмов, устойчивых к определенным группам вирусов.

T5-подобные бактериофаги, на изучение которых направлена работа Голомидовой Аллы Константиновны, являются перспективными агентами фаговой терапии инфекций, вызываемых бактериями семейства *Enterobacteriaceae*. Тем не менее, для их успешного применения в качестве антибактериальных средств необходимо глубокое понимание процессов, лежащих в основе специфичности вирусов к их хозяевам. Поэтому изучение механизмов распознавания бактериофагами различных групп клеточной поверхности чувствительных штаммов представляется важной и актуальной задачей.

**Научная новизна и достоверность результатов и выводов**

Голомидова Алла Константиновна в своей работе изолировала из желудочно-кишечного тракта лошади несколько T5-подобных бактериофагов и детально исследовала два из них, DT57C и DT571/2. На основании данных полногеномного секвенирования они были отнесены к новому виду *Escherichia virus* DT57C рода *Tequintavirus*, который зарегистрирован Международным комитетом по таксономии вирусов. Помимо фагов, из микробного сообщества

желудочно-кишечного тракта лошади были изолированы штаммы *E. coli*, являющиеся их индигенными хозяевами. С использованием методов структурного и функционального анализа Алла Константиновна детально охарактеризовала систему вирус –хозяин для исследуемых фагов.

Для бактериофагов DT57C и DT571/2 установлены первичные рецепторы, в качестве которых выступают O-антигены бактерий-хозяев, а также конечный рецептор, которым является белок внешней мембраны *VtuB*. Автором показано, что боковые хвостовые фибриллы обоих исследуемых фагов имеют разветвлённую структуру и состоят из двух белков – *LtfA* и *LtfB*. Такая структура хвостовых фибрилл впервые показана для T5-подобных бактериофагов. С помощью ЯМР были определены структуры O-антигенов у штаммов *E. coli* HS1/2, HS3-104 и 4S, являющихся естественными хозяевами фагов DT57C и DT571/2.

Несомненный интерес представляют полученные в этой работе данные о нестабильности локуса *ltf*, что, по-видимому, способствует расширению спектра хозяев данных фагов.

По результатам выполненной работы автором сделано пять основных выводов, которые корректно сформулированы и обоснованы.

### Содержание диссертации

Диссертация Голомидовой А.К. построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: оглавление, список используемых сокращений, введение, обзор литературы, экспериментальная часть, заключение, выводы, список литературы и приложение. Диссертационная работа соискателя изложена на 125 страницах, содержит 32 рисунка и 7 таблиц (включая приложение). Список литературы включает 211 источников.

В главе «Введение» автором обосновывается актуальность проблемы, формулируется цель и задачи исследования, а также описывается научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

Раздел «Обзор литературы» состоит из 4 глав. В первой части рассмотрены общие вопросы биологии бактериофагов, такие как распространение фагов в природе, разнообразие вирусов бактерий и их жизненный цикл. Вторая глава раздела посвящена бактериальным механизмам защиты от фаговой инфекции. В главе описаны четыре группы механизмов антифаговой защиты: блокирование адсорбции фагов на клеточной поверхности, предотвращение инъекции фаговой ДНК и её деградация, а также приведены примеры abortивной инфекции. В следующей главе автором обобщены данные по преодолению фагами защитных механизмов бактерий. В соответствии с темой диссертационной работы, наибольшее внимание в этой главе Алла Константиновна уделила вопросам доступности для фагов рецепторов бактерий-хозяев.

Заключительная глава литературного обзора посвящена T5-подобным бактериофагам на примере наиболее изученного прототипа этого рода вирусов, фага T5: детально описана структура его вириона, а также механизм адсорбции на клеточной поверхности. В целом, обзор литературы достаточно полно отражает состояние исследований в рамках темы диссертационной работы и подчеркивает её актуальность.

Глава «Материалы и методы исследования» содержит детальное изложение использованных в работе методов и подходов, достаточное для воспроизведения результатов исследования. Сами исследования выполнены с использованием классических и современных методов микробиологии, молекулярной биологии и биоинформатики. Можно заключить, что выбранные автором методы и подходы адекватны поставленным в диссертационной работе задачам.

Результаты проведенных исследований представлены в 6 подразделах главы «Результаты и обсуждение». Экспериментальные данные изложены подробно. Постановка экспериментов логически обоснована. Первый подраздел посвящен выделению и характеристике колифагов из образцов фекалий лошадей. Всего автором было выделено 10 изолятов колифагов, пять из которых оказались родственными бактериофагу T5. Фаги были охарактеризованы с использованием методов рестрикционного анализа геномной ДНК, секвенирования случайных участков генома, электронной микроскопии, а также анализа спектра хозяйской специфичности. В результате для двух близкородственных изолятов фагов, DT57C и DT571/2, различающихся по спектру хозяйской специфичности, были определены полногеномные последовательности. На основании их анализа последовательности данные бактериофаги были отнесены к новому виду *Escherichia virus* DT57C (род *Tequintavirus*, подсемейство *Tunavirinae*, семейство *Siphoviridae*, порядок *Caudovirales*). Далее Голомидовой А.К. был проведен анализ организации генов адсорбционного аппарата у данных бактериофагов, его генетическая и функциональная характеристика. Было установлено, что вторичным рецептором исследуемых фагов, как и в случае фага BF23, является мембранный белок VtuB, ответственный за транспорт цианокобаламина. На следующем этапе исследований автором была проанализирована организация генов боковых хвостовых фибрилл, проведен биоинформатический и функциональный анализ кодируемых белков. В результате было установлено, что хвостовые фибриллы фагов DT57C и DT571/2 кодируются двумя генами *lftA* и *lftB*. Хвостовая фибрилла, формируемая в составе фаговой частицы белками LftA и LftB, имеет разветвленную структуру, которая впервые описана для T5-подобных фагов. Хвостовые фибриллы исследуемых фагов

ответственны за первичное связывание с поверхностью хозяйской клетки, которое является обратимым. Как установлено автором, в качестве первичных рецепторов данных фагов выступают молекулы О-антигена, при этом оба белка, LtfA и LtfB, участвуют в детерминации хозяйской специфичности.

В диссертационной работе Голомидовой Аллы Константиновны было показано, что лабораторные штаммы бактерий, которые лишены поверхностных полисахаридов (О- и К-антигены), играющих ключевую роль в физиологии бактерий, их взаимодействии друг с другом и различными факторами окружающей среды, не являются подходящей моделью для изучения начальных этапов фаговой инфекции, в частности, механизмов узнавания поверхностных структур клетки. Автором было обнаружено, что двухгенный локус *ltf* генетически нестабилен и склонен к спонтанной инактивации в результате мутаций при культивировании на лабораторных штаммах *E. coli*, не несущих на своей поверхности О-антиген. Данный результат свидетельствует о наличии в природном местообитании фактора отбора, направленного на стабилизацию двухгенной структуры локуса *ltf*, что, по-видимому, способствует расширению спектра хозяев.

В заключительной части подраздела Голомидовой А.К. предложена оригинальная модель стратегии адсорбции Т5-подобных бактериофагов на поверхности бактерий-хозяев, которая объясняет функцию боковых хвостовых фибрилл на начальном этапе инфекции.

В главе «Заключение» диссертации обобщены все результаты работы, обоснованы практические рекомендации и перспективы дальнейших исследований.

В целом, результаты проделанной работы тщательно проанализированы. Выводы, сделанные автором, соответствуют поставленным задачам и согласуются с полученными результатами.

В качестве вопросов и замечаний следует отметить:

1. В диссертационной работе проведено определение нуклеотидной последовательности фагов DT57С и DT571/2. Тем не менее, обсуждение результатов этой части исследований представлены крайне лаконично, в то время как они, наравне с другими, представляют несомненный интерес. Связанное с этим замечание можно отнести к разделу «Обзор литературы», в котором детально описаны особенности структуры вириона фага Т5, как прототипа одноименного рода, но не описаны ни структура генома, ни жизненный цикл вируса.

2. В части результатов анализа автокаталитического процессинга белка LtfB фага DT571/2:  
- при описании плазмидного вектора, использованного для экспрессии гена данного белка в *E. coli*, имеется несоответствие: в разделе «Материалы и методы» указан вектор pTSL,

кодирующий шаперон SlyD (глава 5, стр. 67), тогда как в разделе «Результаты и обсуждение» (глава 6.3.2, стр. 84) – рЕТ-32а, кодирующий тиоредоксин;

- в подписи к рисунку 25 ничего не сказано о природе анализируемых образцов (по-видимому, это грубые экстракты клеток, экспрессирующих исследуемый ген и его мутантную форму?);

- ни в подписи к рисунку, ни в тексте не приведены предсказанные молекулярные веса для слитого белка SlyD-LtfB, а также для продуктов его автокаталитического расщепления;

- на самом рисунке стоило бы привести электрофореграмму белков грубого экстракта клеток *E. coli* до индукции в качестве отрицательного контроля, подтверждающего рекомбинантную природу нарабатываемых белков.

3. Стоит также отметить использование автором жаргонизмов (например, «рестриктаза», «наши фаги»), а также наличие некоторого количества опечаток и неточностей. В качестве примера последних можно привести название главы 1.4: «Жизненный циклы бактериофагов», а также несоответствие нумерации страниц в оглавлении тексту диссертации.

Особо отмечаю, что сделанные замечания можно отнести к недочетам и упущениям. Они не являются принципиальными по отношению к результатам исследования и не умаляют общего хорошего впечатления от диссертационной работы.

### **Публикации**

Результаты диссертационной работы Голомидовой А.К. опубликованы в 7 экспериментальных статьях в рецензируемых изданиях. Данные публикации отражают содержание диссертации. Результаты диссертационной работы также были представлены на 12 российских и международных научных конференциях.

### **Автореферат**

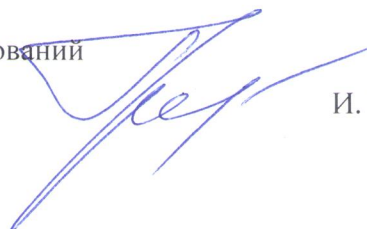
Автореферат выполнен по стандартному плану, содержит все требуемые разделы и в полной мере отражает основное содержание диссертации.

### **Заключение**

Диссертационная работа Голомидовой Аллы Константиновны на тему «Структурная и функциональная организация адсорбционного аппарата T5-подобных бактериофагов DT57C и DT571/2» представляет собой законченное научное исследование, выполненное на высоком

методическом уровне. По актуальности, поставленным целям и задачам, объёму проведённых исследований, новизне полученных результатов, их научной значимости настоящая диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук и критериям, установленным пунктом 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года, а её автор, Голомидова Алла Константиновна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 - микробиология.

Кандидат биологических наук,  
ведущий научный сотрудник,  
и.о. зав. лабораторией энзимологии генетических процессов  
Института биохимии и физиологии  
микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН  
(ИБФМ РАН, обособленное подразделение  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
«Федеральный исследовательский центр  
«Пушкинский научный центр биологических исследований  
Российской академии наук»)



И. Э. Грановский

29.05.2019 г.

142290, Московская обл., г Пушкино,  
пр. Науки, д. 5  
тел. 8 (4967) 319588  
эл. почта: [granovsky@ibpm.pushchino.ru](mailto:granovsky@ibpm.pushchino.ru)

Подпись Грановского И.Э. заверяю,  
Ученый секретарь ИБФМ РАН, д.б.н.  
29.05.2019 г.



Т.А. Решетилова