

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д002.247.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по диссертации Голомидовой Аллы Константиновны на соискание ученой степени кандидата биологических наук.**

Решение диссертационного совета от 17 июня 2019 г. №8 о присуждении Голомидовой Алле Константиновне, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация Голомидовой А.К. «Структурная и функциональная организация адсорбционного аппарата T5-подобных бактериофагов DT57C и DT571/2» по специальности – 03.02.03 – Микробиология принята к защите 10 апреля 2019 г. протокол № 6 диссертационным советом Д002.247.02 на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», 119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, стр.2. Совет утвержден Министерством образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки России) приказом № 205/нк от 16.03.2017 г.

Соискатель **Голомидова Алла Константиновна**, 1981 года рождения, гражданка РФ, в июне 2003 г. окончила ФГОУ ВПО «Московскую государственную академию ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина», ветеринарно-биологический факультет с присуждением квалификации ветеринарный врач-биохимик по специальности «Биохимия». В период 2003-2006 гг. проходила обучение в аспирантуре НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Диссертационную работу соискатель Голомидова А.К. выполняла в лаборатории вирусов микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. С 2006 г. по настоящее время соискатель работает в лаборатории вирусов микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Научный руководитель – Летаров Андрей Викторович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией вирусов микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского, Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Мирошников Константин Анатольевич, доктор химических наук, главный научный сотрудник, и.о. зав. лаборатории молекулярной биоинженерии, ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук;

Грановский Игорь Эдуардович, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки "Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии" (г. Оболенск) – в своем положительном заключении указала, что диссертационная работа представляет собой завершённое научно-квалификационное исследование, соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, а сама автор, Голомидова А.К., заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 «Микробиология».

Выбор официальных оппонентов обусловлен тем, что они являются признанными специалистами в области микробиологии и биотехнологии. Так, доктор химических наук Мирошников Константин Анатольевич известен своими работами в области биохимии, физиологии и генетики бактериофагов, особенности их взаимодействия с бактериальной клеткой. Кандидат биологических наук Грановский Игорь Эдуардович известен своими исследованиями в области биохимических свойств ферментов бактериофагов, в частности эндонуклеаз. Квалификация оппонентов подтверждается наличием большого числа цитируемых публикаций в российских и зарубежных журналах. Выбор ведущей организации связан с тем, что в учреждении проводятся исследования в области физиологии, идентификации бактериофагов, создание способов применения фагов при бактериальных инфекциях. Высокая квалификация оппонентов и ведущей организации позволяет объективно оценить научную и практическую ценность диссертационной работы.

Основные результаты диссертационной работы изложены в 7 статьях в рецензируемых научных изданиях, которые удовлетворяют требованиям п.11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842:

1. **Golomidova A.K.**, Kulikov E.E., Isaeva A.S., Manykin A.A., Letarov A.V. The diversity of coliphages and coliforms in horse feces reveals a complex pattern of ecological interactions // *Appl Environ Microbiol.* – 2007. – V. 73. – № 19. – P. 5975-5981.
2. Летаров А.В., **Голомидова А.К.**, Тарасян К.К. Экологические основы рациональной фаговой терапии // *Acta naturae.* – 2010. – Т. 2. – №1. – С. 66-79.

3. **Golomidova A.K.**, Kulikov E.E., Prokhorov N.S., Guerrero-Ferreira R.C., Ksenzenko V.N., Tarasyan K.K., Letarov A.V. Complete genome sequences of T5-related *Escherichia coli* bacteriophages DT57C and DT571/2 isolated from horse feces // Arch Virol. – 2015. – V. 160. – № 12. – P. 3133-3137.
4. Knirel Y.A., Prokhorov N.S., Shashkov A.S., Ovchinnikova O.G., Zdrovenko E.L., Liu B., Kostryukova E.S., Larin A.K., **Golomidova A.K.**, Letarov A.V. Variations in O-antigen biosynthesis and O-acetylation associated with altered phage sensitivity in *Escherichia coli* 4S // J Bacteriol. – 2015. – V. 197. – № 5. – P. 905-912.
5. Zdrovenko E.L., **Golomidova A.K.**, Prokhorov N.S., Shashkov A.S., Wang L., Letarov A.V., Knirel Y.A. Structure of the O-polysaccharide of *Escherichia coli* O87 // Carbohydr Res. – 2015. – V. 412. – P. 15-18.
6. **Golomidova A.K.**, Kulikov E.E., Prokhorov N.S., Guerrero-Ferreira R.C., Knirel Y.A., Kostryukova E.S., Tarasyan K.K., Letarov A.V. Branched lateral tail fiber organization in T5- like bacteriophages DT57C and DT571/2 is revealed by genetic and functional analysis // Viruses. – 2016. – V. 8. – № 1. – E26.
7. Zdrovenko E.L., Wang Y., Shashkov A.S., Chen T., Ovchinnikova O.G., Liu B., **Golomidova A.K.**, Babenko V.V., Letarov A.V., Knirel Y. A. O-antigens of *Escherichia coli* strains O81 and HS3-104 are structurally and genetically related, except O-antigen glucosylation in *E. coli* HS3-104 // Biochemistry (Mosc). – 2018. – V. 83. – № 5. – P. 534-541.

Результаты работы были также представлены на 9 международных и российских конференциях: на 17<sup>th</sup> Evergreen International Phage Biology Meeting (WA, USA, 2007); на VII международной молодежной школе-конференции "Актуальные аспекты современной микробиологии" (Москва, 2011); на EMBO Workshop-Viruses of microbes - III, IV, V (Brussels, Belgium, 2012; Zurich, Switzerland, 2014; Wrocław, Poland, 2018); на Второй научно-практической конференции с международным участием "Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности" (Санкт-Петербург, 2014); IV<sup>th</sup> Symposium on Phages in interaction (Leuven, The Netherlands, 2015); "100th Celebration of Bacteriophage Research" (Paris, France, 2017); на Четвертой научно-практической конференции с международным участием "Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности" (Нижний Новгород, 2018).

В публикациях отражены результаты экспериментальной части в рамках диссертационной работы.

#### **На диссертацию поступили следующие отзывы:**

**Отзыв официального оппонента доктора химических наук Мирошникова Константина Анатольевича, (положительный).** Отзыв содержит следующие замечания:

«В качестве замечаний можно отметить мелкие технические опечатки и стилистические неудачные формулировки или обороты, а также недостатки в оформлении: многостраничная таблица в приложении 1 и 2 имеет «шапку» с названиями только на первой странице, что затрудняет восприятие представленной в ней информации; в «шапке» таблиц 1 и 2 часть столбцов озаглавлены на русском языке, а часть на английском (стр. 43 и 53); Автор ссылается на приложение 4, однако в нем необходимая информация представлена не полностью. Адсорбционные кривые представлены только для бактериофага DT571/2; автор

ссылается на приложение 3, однако необходимая информация представлена в приложении 2 (стр. 74); для рисунков 18, 19, 21, 22, 23 и 26 не указана программа, с помощью которой было выполнено выравнивание».

**Отзыв официального оппонента кандидата биологических наук Грановского Игоря Эдуардовича (положительный).** Отзыв содержит следующие замечания:

1. В диссертационной работе проведено определение нуклеотидной последовательности фагов DT57C 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 E5, 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:
  - a. 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) - pET-32a, кодирующий тиоредоксин;
  - b. 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?);
  - c. 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;
  - d. 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 «Жизненные циклы бактериофагов», а также несоответствие нумерации страниц в оглавлении тексту диссертации.

**Отзыв ведущей организации** Федерального бюджетного учреждения науки "Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии" (г. Оболенск) – положительный.

«Принципиальных замечаний к диссертационной работе нет. Вместе с тем, следует отметить некоторые недостатки оформления работы.

1. Несколько небрежно оформлен демонстрационный материал (рисунки, таблицы) в экспериментальной части диссертации.

- a. На стр. 69, рис. 14 – к фрагменту А (рестрикционный анализ) нет пояснения и не понятно, что из себя представляют обозначения на электрофореграмме (морфотип фага?, название фага?), и где на рисунке исследуемые фаги. На том же рисунке (фрагмент В) – не соответствуют обозначения на рисунке и в подписи к рисунку.
- b. Таблица 3 (стр. 71) – нет заголовка данных и расшифровки обозначений «+» и «-».
- c. На стр. 72 при описании эксперимента по адсорбции двух исследуемых фагов (DT57C и DT571/2) на 6 штаммах *E.coli* дается ссылка на рисунок приложения 4. Однако на этом рисунке представлены данные по адсорбции только одного фага, причем, обозначенного как DT71/2, на 4 штаммах *E.coli*. Далее, анализируя специфичность адсорбции исследуемых фагов, автор ссылается на результаты табл. 4. Однако в этой таблице представлены результаты изучения «эффективности роста» (т.е. эффективности бляшкообразования, а не специфичности адсорбции) бактериофагов на различных штаммах *E.coli*. В связи с чем сделанный вывод «Эти результаты свидетельствуют о том, что хозяйский спектр исследуемых фагов на штаммах-хозяевах определяется специфичностью их адсорбции» можно считать верным только из общих представлений о биологии фагов, а не из данных, представленных в диссертации.

На стр. 74 при анализе генома фагов автор ссылается на таблицу 3 приложения. Однако в этой таблице представлены олигонуклеотидные праймеры. По-видимому, речь идет о таблице Приложения 2 («Различие генов и ОРС у фагов ...»).

Размещение таблиц и рисунков, в которых представлены основные результаты исследования, в Приложениях, к тому же с ошибками, затрудняет восприятие материала.

Рис. 25 (стр. 85) – представленная электрофореграмма требует объяснения.

Следует также обратить внимание на неудачное расположение некоторых рисунков. Например, рис. 4 упоминается на стр. 30, а расположен на стр. 38. Большая часть данных упомянутой выше таблицы 4 (стр. 73) обсуждается только на стр. 87-88.

2. Встречаются неудачные выражения, например, миграторные инфекции (стр. 5), «домен гидролизует пептидогликаны по средствам» (стр. 36), «неструктурные открытые рамки считывания» (стр. 74), «на С-конце бактериофага T5 Ltf белка» (стр. 84), «консервативные фланки» (стр. 88), фаг-платформы и их таргетирование (стр. 101).
3. Достаточно много ошибок, связанных, по-видимому, с невнимательным переносом текста из разных документов (пропуск и повторение слов, несогласованность отдельных фрагментов текста): «патогенными бактериями» (стр. 6), «Фаги *Haemophilus influenza* фаги» (стр. 24), «обратимо связанные фаги диссоциировать от поверхности клетки сохраняя свою биологическую активность» (стр. 54), «фаги

имели изометрическими головки ... И длинными несократимыми хвостами» (стр. 70), «в присутствии с плазмид», «что в была передана» (стр. 86), «фагов, содержащих разветвленные LTF, многие из которых имеют разветвленные LTF» (стр. 98) и т.п.

Сделанные замечания не умаляют достоинств диссертации. Работа Голомидовой Аллы Константиновны – цельный научный труд, отвечающий на поставленные задачи и имеющий перспективу для дальнейших исследований».

**На автореферат поступили положительные отзывы. Отзывы прислали:**

1. Асланов Б.И. - д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии ФГБОУ ВО Северо-западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова Минздрава России;
2. Кайшева А.Л. - к.б.н., с.н.с. лаборатории нанобиотехнологии ФГБНУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича. Замечания: «В тексте автореферата имеются отдельные опечатки, стилистические ошибки и неточности, в частности, в описании к рисунку 1 (В) не указан метод, с помощью которого получены изображения, а на рис. 3 и 4 не указан ресурс, с помощью которого было выполнено выравнивание».
3. Корниенко М.А. – к.б.н., н.с. лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства. Замечания: «В качестве незначительного замечания к работе можно отметить использование тривиальных названий вновь выделенных бактериофагов, не соответствующее рекомендациям ICTV (международного комитета по номенклатуре вирусов);
4. Морозова В.В. – к.б.н., с.н.с. лаборатории молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук;
5. Ярыгина Е.И. – д.б.н., профессор кафедры радиобиологии и вирусологии имени академиков А.Д. Белова и В.Н. Сюрин ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»;
6. Алешкин А.В. – д.б.н., профессор РАН, гл.н.с., руководитель Научно-методического центра по изучению и идентификации бактериофагов ФБУН «Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора. Замечания: «Незначительное количество опечаток, ряд стилистических неточностей, замеченных в автореферате, не носят принципиального характера и не снижают ценности проделанной работы»;
7. Скобликов Н.Э. – к.м.н., заведующий лабораторией микробиологии ФГБНУ «Краснодарский научный центр по зоотехнологии и ветеринарии. Замечания: 1) слабо акцентирована актуальность темы исследования; 2) мало обоснован выбор конкретных объектов исследования».
8. Прохоров Н.С. – к.б.н., postdoctoral fellow Medical Branch, University of Texas, USA
9. Крылов Н.В. – д.б.н., профессор, заведующий лабораторией генетики бактериофагов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова.

**Все отзывы положительные.**

**Вопросы задавали:** чл.-корр. РАН, д.б.н. Гальченко В.Ф., д.б.н. Дедыш С.Н., д.б.н. Равин Н.В., д.б.н. Пименов Н.В.

**В дискуссии приняли участие:** д.б.н. Дедыш С.Н., чл.-корр. РАН, д.б.н. Гальченко В.Ф., д.б.н. Пименов Н.В.

**Диссертационный совет отмечает, что** диссертация Голомидовой А.К., посвященная исследованию организации адсорбционного аппарата новых T5-подобных бактериофагов и определению стратегии распознавания ими клеток хозяев, является завершенным научным исследованием. В работе подробно изучены T5-подобные бактериофаги DT57C и DT571/2 и механизмы их взаимодействия со штаммами хозяев *E. coli* HS1/2 (O87), HS3-104 (O81), 4S (O22). Впервые показано, что латеральные хвостовые фибриллы (LTF) изученных фагов имеют разветвленную структуру и состоят из двух белков – LtfA и LtfB. Ранее такая структура не была описана у T5-подобных бактериофагов. Оба эти белка имеют свои рецептор-узнающие домены. Установлено, что эти белки распознают полисахаридные лиганды (O-антигены клеток), обеспечивая возможность проникновения осевой фибриллы к конечному рецептору (в случае фагов DT57C и DT571/2 – белку-транспортеру внешней мембраны BtuB *E. coli*).

Исследование свойств T5-подобных бактериофагов DT57C и DT571/2, а также их взаимодействия с клетками *E. coli* позволило существенно расширить знания о механизмах детерминации спектров хозяев T5-подобных бактериофагов.

**Теоретическая значимость работы обоснована тем,** что в ней предложена концептуальная модель стратегии адсорбции T5-подобных фагов с разветвленной структурой LTF на O-антиген продуцирующих штаммах. Показано, что распознавание рецепторов (O-антигены) LTF является критически необходимым для инфицирования клеток, продуцирующих O-антигены. При этом каждый из представленных белков (LtfA и LtfB) специфичен по отношению к разным серогруппам O-антигенов.

Полученные результаты дают возможность предсказывать вероятные пути адсорбции исследуемых бактериофагов уже на уровне генной организации и выбирать рациональные пути исследования биологии бактериофагов.

В ходе исследования были определены новые, ранее не охарактеризованные структуры O-антигенов (*E. coli* HS1/2 (O87) и HS3-104 (O81)).

Проведенная работа является основой для дальнейших исследований организации адсорбционного аппарата других T5-подобных бактериофагов, а также для более детального изучения принципов и характера взаимодействий фагов с клетками бактерий.

Это позволит разработать требования к составу эффективных терапевтических коктейлей бактериофагов, а также выработать подходы к усилению действия фаговых препаратов.

**Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что T5-подобные бактериофаги являются перспективными агентами антибактериальной фаговой терапии инфекций, вызываемых бактериями сем. *Enterobacteriaceae*, в том числе штаммами, устойчивыми к антибактериальным препаратам. Обнаруженная разветвлённая организация LTF упрощает создание систем искусственного управления хозяйской специфичностью этих фагов для повышения эффективности их адсорбции на клетках различных штаммов патогенной *E. coli*.**

Полученные в работе данные позволяют предположить, что для модификации спектра хозяев можно проводить целенаправленную замену фрагментов рецептор-узнающих доменов белков LtfA и LtfB на фрагменты из структурно-сходных доменов, которые распространены у различных бактериофагов.

Основываясь на полученных в диссертационной работе данных возможно предположить, что искусственная модификация спектров хозяев одного или нескольких фагов могла бы позволить таргетировать их к различным уропатогенным штаммам *E. coli* (UPEC), при этом фаг может быть всесторонне исследован (и модифицирован) для обеспечения его безопасности и улучшения параметров фармакокинетики.

**Оценка достоверности результатов исследования выявила, что результаты воспроизводимы и получены на сертифицированном оборудовании. Диссертационная работа Голомидовой А.К. выполнена с применением комплекса современных микробиологических, биохимических и молекулярно-генетических методов.**

По материалам диссертации опубликовано 19 печатных работ, из них 7 статей в периодических изданиях, включённых в перечень ВАК, 12 тезисов конференций. Автореферат полностью отражает основные научные результаты диссертации.

**Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов, а также обработке и интерпретации полученных результатов, подготовке публикаций по выполненной работе, участии в конференциях.**

Диссертация Голомидовой А.К. «Структурная и функциональная организация адсорбционного аппарата T5-подобных бактериофагов DT57C и DT571/2» представляет собой завершённую научно квалификационную работу, внесшую большой вклад в



изучение структуры и функций T5-подобных фагов. Работа соответствует требованиям п.9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 (ред. от 28.08.2017), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Голомидова А.К., заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 Микробиология.

На заседании 17 июня 2019 г. Диссертационный совет принял решение присудить Голомидовой Алле Константиновне ученую степень кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – Микробиология.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 18 чел., из них 10 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации, участвовавших в заседании, из 21 человека, входящего в состав совета, проголосовали «за» присуждение ученой степени – 18, «против» - 0, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета Д002.247.02  
ФИЦ Биотехнологии РАН,  
Доктор биологических наук



Н.В. Пименов

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д002.247.02  
ФИЦ Биотехнологии РАН,  
Доктор биологических наук

Т.В. Хижняк

17 июня 2019 г.