

«Утверждаю»
Зам. Директора Института
молекулярной биологии им. В.А.
Энгельгардта РАН
доктор физ.-мат. наук, проф.



А.С. Заседателев

«16» сентября 2014 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о диссертационной работе А.Ю. Горбачева «Система репарации ДНК у бактерии *Mycoplasma gallisepticum*», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.04 – «Биохимия» и 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Диссертационная работа Горбачева А. Ю. посвящена актуальной теме – исследованию отдельных путей репарации ДНК в «минимальной» бактериальной клетке – *Mycoplasma gallisepticum*. Для данного микроорганизма характерна значительная редукция генома, в том числе генов, ответственных за репарацию ДНК. По данной причине *M. gallisepticum* является хорошим объектом изучения путей репарации ДНК, ранее не исследованных для классического модельного объекта – *Escherichia coli*. Несмотря на малые размеры генома и, как следствие, малое число генов – у *M. gallisepticum* их всего 878 – эта бактерия демонстрирует способность к самостоятельному росту на искусственных питательных средах. Еще одной особенностью *M. gallisepticum*, относящей ее к очень интересным научным объектам, является присутствие в ее геноме отдельных высоко вариабельных областей – участков, кодирующих поверхностные антигены, необходимые для взаимодействия с клетками хозяина. Частота мутаций в данных областях может достигать 10^{-5} мутаций на одну пару оснований в геноме за одно поколение, что является чрезвычайно большим значением. При этом средняя

частота однонуклеотидных замен в геноме у *M. gallisepticum* соответствует таковой у *E. coli*.

Диссертационная работа изложена на 141 странице, состоит из введения, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, основных выводов, списка литературы и приложений.

Во введении автор проводит подробный обзор литературы по различным системам репарации ДНК у бактерий, в том числе останавливаясь на работах, посвященных микоплазмам, что позволяет правильно оценить актуальность и новизну проведенного исследования.

Основная часть диссертационной работы состоит из нескольких независимых частей, объединенных общей темой.

В первой части исследования диссертантом был проведен скрининг клеточного экстракта *M. gallisepticum* с целью выявления белков, способных связывать ДНК-мисматчи. Для этого применен методический подход, основанный на двумерном разделении белков. В первом направлении использован метод торможения ДНК в геле. При этом для выявления целевых белков использована ДНК, содержащая неканоническое спаривание – мисматч. После нативного разделения белков в первом направлении, они были подвергнуты последующему электрофоретическому делению в денатурирующих условиях. Полученные таким образом отдельные белки были расщеплены трипсином в геле, а затем с использованием масс-спектрометрии были идентифицированы белки-кандидаты, способные связывать ДНК-мисматчи. В результате этой части работы был идентифицирован белок HimA, способный связывать поврежденную ДНК. Полученные результаты впервые указывают на существование системы репарации ДНК-мисматчей, что указывает на несомненную новизну данной работы.

Во второй части диссертационной работы автор проводит подробный биоинформатический анализ генома *M. gallisepticum* с целью выявить все гены, продукты которых могут являться потенциальными участниками репарации. После аналитической работы, автор подтверждает активность найденных генов на уровне транскрипции и трансляции. В этой части исследования автор применяет новый подход, подразумевающий мониторинг сразу всех генов, продукты которых могут быть вовлечены в репарацию ДНК.

В третьей части своего исследования автор пытается ответить на вопрос: как система репарации ДНК участвует в адаптации клеток к различным стрессовым воздействиям. В результате проделанной работы автор обнаруживает SOS-ответ у *M. gallisepticum* – универсальную систему защиты бактериальной клетки в условиях стресса, которая ранее для микоплазм не была описана.

Следует также отметить, что в представленной работе применен значительный методический арсенал. Были использованы как классические биохимические и молекулярно-биологические методы, так и современные методы высоко-производительной масс-спектрометрии.

К недостаткам данной работы следует отнести ее чрезмерную разноплановость. В одной работе автор осуществлял поиск мисматч-связывающего белка, исследовал транскрипционный ответ системы репарации в условиях стресса, а также проводил биоинформатический поиск участников различных систем репарации. Представляется более логичным ограничить содержание работы одним из трех направлений и провести детальное исследование. Например, было бы интересно более подробное изучение роли идентифицированного в работе белка HimA в системе репарации ДНК-мисматчей. Данное замечание может быть использовано в качестве рекомендации для будущих исследований. Кроме того, следует отметить, что в представленной работе присутствуют опечатки, англицизмы,

а также орфографические ошибки, однако их общее количество в тексте не является значительным.

Несмотря на приведенные замечания, диссертационная работа «Система репарации ДНК у бактерии *Mycoplasma gallisepticum*» является законченным научным исследованием, имеющим большую значимость для биохимии и молекулярной биологии бактерий.

Методы и результаты выполненного исследования могут быть полезны в работах ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН, НИЦ «Курчатовский институт», института микробиологии РАН, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, диссертационная работа А.Ю. Горбачева «Система репарации ДНК у бактерии *Mycoplasma gallisepticum*» является законченной научно-квалификационной работой и отвечает требованиям п.9 Положения «О порядке присуждения учёных степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.04 – «Биохимия» и 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Отзыв заслушан и одобрен на заседании научного коллоквиума Лаборатории регуляции внутриклеточного протеолиза 8 сентября 2014 г. (Протокол № 8).

Заведующий Лабораторией регуляции внутриклеточного протеолиза Федерального государственного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, доктор биологических наук, профессор _____ В.Л. Карпов

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32
Тел. +74991359933, email: karpov@eimb.ru

