

ОТЗЫВ

на диссертационную работу Горбачева А.Ю.

«Система репарации ДНК у бактерий *Mycoplasma gallisepticum*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03-01-04 – биохимия и 03-01-03 – молекулярная биология. Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», в лаборатории протеомного анализа.

Целью рецензируемой диссертации явилось изучение состава и функциональной активности системы репарации ДНК у бактерии *Mycoplasma gallisepticum*. Идентификация состава и функциональной активности системы репарации является базисной основой в расшифровке фундаментальных механизмов регуляции адаптогенеза биообъекта к меняющимся условиям внешней среды, осуществляемой координацией генетических и эпигенетических процессов. Именно с этих позиций выбор биообъекта представляется адекватным, поскольку, относительно минимизированная система репарации позволяет исследователю в достаточно полном объеме изучить регуляцию наблюдаемых функциональных трансформаций, в целом.

Главным преимуществом данной модели является тот факт, что, обладая средней частотой однонуклеотидных мутаций *in vitro*, соизмеримой с таковой для традиционных объектов (например, *E. coli*), она имеет геномные зоны, подверженные чрезвычайно высокой изменчивости (10^{-5} мутаций на одну п.о. в геноме за поколение).

Автор в разделе “научная новизна” акцентирует достижение, связанное с идентификацией белка Nim A, способного связываться с ДНК в зонах ошибочно-спаренных нуклеотидов в процессе мис-матч-репарации. В общем контексте проблем мисс-матч-репарации подобные системы традиционно относятся к основным для коррекции замен оснований, инсерций и делеций, как у бактерий, так и у высших организмов.

По мнению рецензента, не менее значима научная новизна исследований SOS-ответов, включающихся в расшифровку кооперативных генетических и эпигенетических механизмов регуляции. Данное уточнение не может быть отнесено к замечаниям, поскольку оценка новизны собственных результатов является прерогативой автора.

Диссертационная работа содержит краткое введение, обзор литературы и три главы собственных исследований. Ограничусь лишь общим заключением, что перечисленные разделы изложены в традиционном варианте, и у рецензента не возникает замечаний.

В трех частях собственных исследований, по моему мнению, автор предстает в трех ипостасях: в 1 части – доскональным методологом, во 2

части – углубленным аналитиком и в 3 части – синтезатором продуктивных концепций. Сразу отмечу, что выбранная нетрадиционная форма рецензирования была подсказана фактическим содержанием каждой из частей, требующих в разной степени мобилизации перечисленных качеств.

В 1-ой части собственных исследований в основном приводятся результаты идентификации белков, специфически узнающих и связывающих типичные для мис-матч-репарации повреждения ДНК. Для реализации этой задачи были использованы методы разделения белков связывающихся с ДНК, с их последующей масс-спектрометрической идентификацией. При этом, способность связывания с ошибочными спариваниями доказывалась сиквенс-специфичностью: олигонуклеотид, содержащий СС-пару демонстрирует лучшее спаривание с белком. Для очистки белковых компонентов использовался двумерный гель-электрофорез с последующей спектрометрической детекцией белковых пятен методом фингерпринта с использованием времяпролетной масс-спектрометрии с МАЛДИ ионизацией. Белок, соответствующий специфическому ДНК-белковому комплексу был идентифицирован как продукт гена *himA/hup2*, кодирующий полипептид с молекулярной массой 9 кДа. Белок *himA/hup2* автором обозначен *mgHU* и его способность к связыванию “поврежденной” ДНК была установлена на очищенном варианте. Для этого, ген *himA/hup2* из *M. gallisepticum* был клонирован и экспрессирован в *E. coli*, с последующей очисткой белка.

На основе суммирования результатов исследования способности белка *mgHU* связывать дц ДНК, содержащие инсерции А, С, или Т, он был идентифицирован как белковый фактор, способный специфически связывать ДНК, содержащую ошибочные нуклеотиды.

Многоэтапный и многофакторный анализ идентифицированного *mgHU* белка доказывает его принадлежность к мис-матч-репарации, наличие которой у *Mollicutes* оставалась под вопросом. Освоив трудоемкий методологический этап и доказав присутствие белковых компонентов, необходимых для мис-матч-репарации, автор приступил ко 2-ой части работы: аналитической реконструкции всей системы репарации ДНК у *M. gallisepticum*. Для этого, прежде всего, была проведена ее *in silico* реконструкция: был составлен список всех генов, вовлеченных в репарацию ДНК у *E. coli* и у *Bacillus subtilis* (наиболее исследованных по данным репарационной литературы). Для каждого из генов этого списка был осуществлен поиск гомологов в геноме *M. gallisepticum*. Для проведения подобного анализа были произведены выравнивания аминокислотных последовательностей с соответствующими им гомологами из *E. coli*.

Функциональное предназначение системы мис-матч-репарации в клетке *M. gallisepticum* изучалось на транскрипционном и белковом уровнях. На транскрипционном уровне, на основе подсчета числа копий мРНК на один геном *M. gallisepticum*, было установлено, что представительство транскриптов довольно низкое, и в большей части клеток, транскрипты генов, кодирующих белки репарации, отсутствуют.

Функциональное предназначение участников систем репарации на белковом уровне, устанавливалось методом хромато-масс-спектрометрии. Идентифицировано 17 белков репарации для 19-ти генов.

Сопоставление результатов, полученных на транскрипционном и белковом уровнях, позволяет утверждать, что низкая транскрипционная активность достаточна для необходимого уровня функционирования репарационных белков и обеспечивает приемлемый уровень выживаемости *M. gallisepticum*.

В главе 3 осуществляется подробный анализ вариабельности транскрипционного профилирования в различных фазах клеточного роста и при различных вариантах индукции SOS-систем. Проведен подробный дифференциальный анализ SOS-ответа, индуцированного, как тепловыми, так и химическими воздействиями, совокупный анализ которых достаточно строго доказывает функциональную состоятельность SOS-систем в клетках *Mollicutes*, что ранее в исследованиях других авторов не устанавливалось. Особый интерес, по мнению рецензента, вызывает сосредоточенность автора на предположении, что “увеличение уровня мРНК большинства генов репарации может быть, скорее, следствием глобального механизма регуляции, чем одного транскрипционного фактора”. С целью поддержки сформулированного положения автор синтезировал результаты протеомного профилирования, полученные методом двумерного гель-электрофореза с дифференциальной окраской цианинами. Внутренним контролем служили известные белки теплового шока – шаперон ClpB и кошаперонин GroES, идентифицированные в динамике тепловой обработки. В этих условиях возрастал уровень белков, участвующих в трансляции и транскрипции. Однако, особое внимание к результатам протеомного профилирования привлекло возрастание уровня белка НАДН-оксидазы, хорошо известного маркера многих трансформаций, сопровождающих метаболизм пирувата. Учитывая известное предназначение НАДН-оксидазы в ускорении гликолиза и синтеза АТФ, была осуществлена прямая детекция внутриклеточного АТФ с помощью биолуминисцентного анализа люцеферин/люцеферазной реакции. При этом, установлено семикратное увеличение уровня АТФ в клетках *M. gallisepticum* в процессе теплового шока. В этих же условиях определялся уровень накопления H_2O_2 , свидетельствующий о повышенной генерации активных форм кислорода. Таким образом, принципиально важное синтетическое положение автора о существовании глобального механизма регуляции адаптивных потенций *M. gallisepticum* в меняющихся условиях внешней среды, получило достаточно аргументированную экспериментальную поддержку. По мнению рецензента, это одно из важных фундаментальных достижений данных исследований, закладывающих основу в расшифровку кооперативной генетической и эпигенетической регуляции процессов адаптации биообъектов к меняющимся условиям внешней среды.

Высоко оценивая рецензируемую диссертацию, в целом, представляется необходимым высказать мнение о названии работы. В работе

исследуется только мис-матч-репарация, имеющая свое строго отличительное важное назначение. С этих позиций название диссертации “Система **мис-матч**-репарации ДНК у бактерии *M. gallisepticum*” представляется более точным. Другое замечание касается часто употребляемого по всей диссертации рефрена: “SOS-ответ в условиях стресса”. SOS-система включается только в ответ на воздействие индуктора (стресса). При этом, природа индуктора во многом определяет вариативность функционирования SOS-системы, чему в работе приведены достаточно многочисленные доказательства. Понятно, что SOS-ответ в отсутствие индуктора не изучался.

По диссертации опубликованы 3 зарубежные статьи, содержащие наиболее значимые результаты. Выводы адекватно обоснованы. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

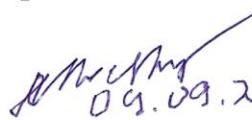
По актуальности проблемы, методическим подходам и оригинальности полученных результатов исследование Горбачева А.Ю. полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года №842, предъявляемым к кандидатским диссертациям.

Данная работа соответствует специальности 03.01.04 – биохимия и 03-01-03 – молекулярная биология и может быть рекомендована к защите в соответствующем диссертационном совете на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Заведующий лабораторией медицинской биофизики
Отделения молекулярной и радиационной биофизики
ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова»

Национальный исследовательский центр
«Курчатовский институт»
д.б.н., профессор

Подпись рук. Носкина Л.А. заверяю


09.09.2014 г.
Носкин Л. А.

Ученый секретарь

к.ф-м.н. Зобкало И.А.

Контакты

Носкин Л. А. дом адрес: 188308 Гатчина Ленинградской обл.
ул. Коли Подрядчикова, д.13 кв. 81
д.т. 81371-31974, м.т. +7(965)344-58-72,
E-mail: noskin@gtn.ru

ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова»
Национальный исследовательский центр
«Курчатовский институт»
188300 Гатчина, Орлова роща, 1