

ОТЗЫВ
официального оппонента на диссертационную работу
ГОРБАЧЕВА АЛЕКСЕЯ ЮРЬЕВИЧА
«СИСТЕМА РЕПАРАЦИИ ДНК У БАКТЕРИИ MYCOPLASMA GALLISEPTICUM,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.03 – молекулярная биология

В процессе жизнедеятельности клетки её ДНК подвергается различным воздействиям, приводящим к нарушениям в структуре двойной спирали. Ключевую роль в поддержании стабильности и целостности генома играют системы, исправляющие различные повреждения в ДНК (системы репарации). Отсутствие таких систем или нарушение их работы приводит к мутантному фенотипу клеток, как в бактериях, так и у человека. Во многих лабораториях мира проводятся структурно-функциональные исследования белков, входящих в ту или иную систему репарации. Интерес к таким исследованиям связан с желанием глубже понять созданные природой способы ликвидации ошибок в ДНК и пути координации действия биомолекул – участников репарационного процесса. В связи с этим диссертационная работа Горбачева А.Ю., направленная на изучение систем репарации у таких бактерий, как микоплазмы, являющихся паразитами человека и сельскохозяйственных животных, представляет собой, безусловно, своевременную и актуальную задачу.

Следует отметить, что основным достоинством диссертационной работы Горбачева А.Ю. и отличием её от многих исследований, моделирующих клеточные процессы на уровне взаимодействия синтетических фрагментов ДНК с рекомбинантными молекулами белков, является использование в качестве «источника белков» клеточных экстрактов бактерии *Mycoplasma gallisepticum*. В результате автором были найдены четыре ранее не аннотированных белка, возможно участвующих в репарации ДНК. Настоящим открытием диссертационной работы является обнаружение в *M. gallisepticum* гистоноподобного белка mgHU (Hup2) и характеристика его способности связывать неканонические пары нуклеотидов («мисматчи»). На сегодняшний день это первое и единственное доказательство существования у микоплазм важнейшей биохимической системы репарации «мисматчей» - MMR. Таким образом, новизна исследований Горбачева А.Ю. не вызывает сомнения.

Диссертационная работа построена не совсем традиционно. Она состоит из вводной части, а также следующих основных разделов «Введение», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение». Вводная часть дублирует стр. 1-4 автореферата, а также содержит список публикаций по теме диссертации. Следующая часть – «Введение» - фактически представляет собой обзор литературы. В этой части кратко, но достаточно информативно рассматриваются основные системы репарации, обнаруженные, главным образом, в грам-отрицательной бактерии *E. coli* и в грам-положительной бактерии *B. subtilis*. Несомненным достоинством обзора является наличие в конце каждого подраздела сведений о том, что известно об обсуждаемой системе репарации для бактерии *M. gallisepticum*. Таким

образом, представленный в разделе «Введение» материал действительно вводит читателя в проблематику работы и позволяет оценить новизну и оригинальность полученных автором результатов.

Раздел «Материалы и методы» содержит необходимую информацию для понимания и воспроизведения экспериментальных методик. Следует отметить сложность и многоплановость методических приемов, использованных в работе.

Раздел «Результаты и обсуждение» представлен в виде, чрезвычайно удобном для прочтения. В каждом подразделе автор не только обсуждает полученные результаты, но и сопоставляет их с данными литературы и выдвигает гипотезы, объясняющие представленные в работе данные.

Переходя к сути работы, следует сказать, что Горбачевым А.Ю. предпринято первое комплексное исследование репарационных процессов у патогенного микроорганизма, принадлежащего к классу Mollicutes, для представителей которого характерно отсутствие клеточной стенки. Отправной точкой исследования послужил скрининг клеточного экстракта *M. gallisepticum* на наличие в нем белков из системы MMR с помощью синтетических фрагментов ДНК различной структуры. Как уже упоминалось, такой белок, mgHU, был обнаружен в процессе выполнения данного исследования. Получена рекомбинантная форма этого белка и детально изучено его связывание с ДНК-дуплексами, содержащими различные неканонические пары нуклеотидов и нуклеотидные вставки («инсерции»).

На следующем этапе Горбачев А.Ю. разработал стратегию исследования, позволившую ему охарактеризовать репарационный аппарат *M. gallisepticum*. Прежде всего, это биоинформатический анализ, в результате которого были установлены гены белков репарации, затем - исследование транскрипции этих генов методом ПЦР. Далее была проведена исчерпывающая идентификация всех белков в клетках *M. gallisepticum* с использованием сложнейшего инструментального метода масс-спектрометрии. Хочу особенно отметить, что описанная на двух страницах (стр. 78-79) часть работы просто колоссальна по объему. Диссертант идентифицировал 561 белок, из которых 17 являются участниками репарационных процессов. Затем был выполнен детальный анализ клеточного ответа – транскрипции генов и уровня экспрессии белков систем репарации – в ответ на стрессовые условия. Такой комплексный подход позволил Горбачеву А.Ю. сделать фундаментальное открытие – показать присутствие в *M. gallisepticum* ключевых белков всех основных систем репарации при отсутствии белков-дублеров.

Уже этих результатов было бы достаточно для успешной защиты диссертации, однако автор изучил еще и влияние критических воздействий на метаболизм в *M. gallisepticum*, с помощью оригинальных методик показал повышение уровня внутриклеточного АТФ и активных форм кислорода. Впервые продемонстрировано наличие SOS-ответа у микоплазм в условиях стресса.

К первой части работы имеется несколько замечаний.

1. Стр. 66. В ходе изучения связывания белка mgHU с синтетическими фрагментами ДНК автор утверждает, что рассчитывает абсолютные значения констант диссоциации (K_d) ДНК-белковых комплексов. Однако K_d , определенные биохимическими методами, являются кажущимися, так как их значения существенным образом зависят от условий проведения эксперимента. Сравнивая интенсивность зоны, соответствующей анализируемому комплексу, с интенсивностью зоны, соответствующей комплексу белка mgHU с ДНК, содержащей инсерцию A7, диссертант, на самом деле, определяет относительную эффективность связывания белка с ДНК по сравнению с контрольным субстратом. Далее автор указывает, что для комплекса mgHU с ДНК, несущей «инсерцию» A7, значение K_d было точно рассчитано, как описано в разделе 2.7. В этом разделе действительно приводятся уравнения. Однако рассчитать K_d с помощью метода торможения в геле (так написано в работе, стр. 40) нельзя. Этот метод позволяет детектировать образование белково-нуклеиновых комплексов. K_d определяют из зависимостей эффективности комплексообразования от концентрации одного из участников взаимодействия. Из описания неясно, концентрацию какого компонента варьировал автор и в каком диапазоне, какова была концентрация другого компонента. Экспериментальные данные (электрофореграммы, графики) этого важного эксперимента отсутствуют.

2) На стр. 69-72 обсуждается структура белка mgHU в сравнении с HU-подобными белками из других бактерий. Вызывает сожаление, что автор не попытался сделать прецизионное сравнение первичной, вторичной и третичной структуры mgHU с ДНК-связывающим мотивом сенсорного белка системы MMR – MutS, ответственного за узнавание «мисматчей» и «инсерций». Возможно, это помогло бы прояснить механизм взаимодействия mgHU с поврежденной ДНК.

3) Определенную растерянность вызывает раздел диссертации 3.6. - «Комплементационный тест» (см. также стр. 11-12 автореферата), в начале которого указано, что результаты теста были получены коллегой из Франции. Однако далее автор перечисляет полученные результаты, практически в каждом предложении употребляя местоимение «мы». Поэтому, так и остается неясным, кем же сделан этот фрагмент работы.

Следует указать также ряд замечаний технического характера. Подписи на всех рисунках сделаны на английском языке, не везде в подписях к рисункам присутствует расшифровка обозначений. Из часто встречающихся погрешностей можно отметить отсутствие пробелов между словами. Есть неудачные выражения, например, «гены репарации», «ДНК, содержащая ошибочное спаривание», «однонуклеотидное неправильное спаривание», «пиримидин-пиримидиновое спаривание» и тому подобное. В русскоязычной научной литературе принят термин – неканоническая пара нуклеотидов (нуклеозидов, оснований), в англоязычной – «мисматч».

Указанные недостатки не снижают общей высокой оценки диссертационной работы Горбачева А.Ю. В ней решена задача, имеющая существенное значение для биохимии и молекулярной биологии – охарактеризованы системы репарации у бактерии *Mycoplasma gallisepticum*. Выводы работы соответствуют полученным результатам, автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации.

Методы и подходы, предложенные Горбачевым А.Ю., могут быть использованы в лабораториях, где изучаются взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами, а также проводятся работы с клеточными экстрактами, в которых необходимо идентифицировать ДНК- и РНК-узнающие белки, в частности Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, на химическом факультете и в 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*» полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, изложенным в пункте 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» № 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.01.04 - биохимия и 03.01.03 - молекулярная биология.

Главный научный сотрудник отдела химии нуклеиновых кислот
Научно-исследовательского института физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
профессионального образования «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»,
доктор химических наук, профессор



Е.А. Кубарева

05.09.2014

119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 40
тел.: +7(495)939-54-11, e-mail: kubareva@belozersky.msu.ru

Подпись Кубаревой Е.А. заверяю.

Директор Научно-исследовательского института физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
профессионального образования «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»,
академик РАН



В.И. Скулачев