

**Заключение диссертационного совета Д 001.010.01 на базе
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени
В.Н. Ореховича» по диссертации на соискание ученой степени кандидата
наук**

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 25 сентября 2014 г. № 4

О присуждении Горбачеву Алексею Юрьевичу, гражданину РФ ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Система репарации ДНК у бактерии *Mycoplasma gallisepticum*» по специальностям 03.01.04 – биохимия и 03.01.03 – молекулярная биология принята к защите 26 июня 2014 г., протокол № 2 диссертационным советом Д 001.010.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича» Российской академии медицинских наук, 119121, Россия Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8, Приказ Минобрнауки России № 105/нк от 11.04.2012 г

Соискатель, Горбачев Алексей Юрьевич, 1987 года рождения.

В 2009 году Горбачев А.Ю. окончил Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. В 2012 г. окончил очную академическую аспирантуру по специальности 03.01.04 – «биохимия» при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства».

Диссертация выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» в лаборатории протеомного анализа.

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН Говорун Вадим Маркович, заместитель директора по науке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»;

кандидат биологических наук, Камашев Дмитрий Эдуардович, старший научный сотрудник лаборатории протеомного анализа Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства».

Официальные оппоненты:

1. Носкин Леонид Алексеевич доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение "Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова" Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», заведующий лабораторией;

2. Кубарева Елена Александровна доктор химических наук, профессор, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» главный научный сотрудник

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, в своем положительном заключении, подписанном заведующим лабораторией регуляции внутриклеточного протеолиза Федерального государственного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, доктором биологических наук, профессором В.Л. Карповым, указала, на ее чрезмерную

разноплановость, а также что было бы более логично, ограничить содержание работы одним из трех направлений и провести более детальное исследование. Однако, в целом, работа представляет собой актуальное законченное исследование, выполненное на высоком научном уровне и имеющее как практическое, так и фундаментальное значение.

Соискатель имеет 8 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 8 работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях 4.

Наиболее значимые научные работы по теме диссертации:

1. Kamashev D., Oberto J., Serebryakova M., Gorbachev A., Zhukova Y., Levitskii S., Mazur A., Govorun V. Mycoplasma gallisepticum produces a histone-like protein that recognizes base mismatches in DNA // Biochemistry. 2011. V. 50. P. 8692–8702. Работа посвящена поиску белка в клеточном экстракте *M. gallisepticum*, обладающему способностью узнавать и связывать ДНК-мисматчи. В данной работе соискатель участвовал в планировании и выполнении экспериментов, анализе полученных данных и написании статьи.
2. Gorbachev A. Y., Fisunov G. Y., Izraelson M., Evsyutina D. V., Mazin P. V., Alexeev D. G., Pobeguts O. V., Gorshkova T. N., Kovalchuk S. I., Kamashev D. E., Govorun V. M. DNA repair in Mycoplasma gallisepticum. // BMC Genomics. 2013. V. 14. № 1. P. 726-737. Работа посвящена ответу *M. gallisepticum* на спектр стрессовых воздействий в контексте работы системы репарации. В работе проводится исследование транскрипционного ответа *M. gallisepticum* на стресс. В данной работе соискатель участвовал в планировании и выполнении экспериментов, анализе полученных данных и написании статьи.
3. Vanyushkina A. A., Fisunov G. Y., Gorbachev A. Y., Kamashev D. E., Govorun V. M. Metabolomic Analysis of Three Mollicute Species. // PLoS One. 2014. V. 9. № 3. P. 1-16 (e89312) Работа посвящена анализу метаболомов *M. gallisepticum* и двух других видов микоплазм. В работе проводится исследование метаболических путей *M. gallisepticum*. В данной работе соискатель участвовал в планировании экспериментов, анализе полученных данных, а также написании статьи.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы от:

- 1) Абрамова С.М., кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника кафедры микробиологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»;
- 2) Каменского П.А., кандидата биологических наук, ведущего научного сотрудника кафедры молекулярной биологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»;
- 3) Бойко К.М., кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии им. А.Н. Баха РАН;

В отзыве официального оппонента д.б.н. Носкина Л.А. высказан ряд замечаний. В частности выражено мнение, что более точным было бы название работы «Система мис-матч-репарации ДНК у бактерии *M. gallisepticum*». Другое замечание касается часто употребляемого по всей диссертации рефрена «SOS-ответ в условиях стресса». Отмечено, что SOS-система включается только в ответ на воздействие индуктора (стресса).

В отзыве официального оппонента д.х.н. Кубаревой Е.А. указан ряд замечаний технического характера. Подписи на всех рисунках сделаны на английском языке, не везде в подписях к рисункам присутствует расшифровка обозначений. Кроме того, сделаны критические замечания к методу оценки констант диссоциации ДНК-белковых комплексов. Высказано сожаление, что в работе не присутствует прецизионное сравнение первичной, вторичной и третичной структуры mgHU с ДНК-связывающим мотивом сенсорного белка системы MMR – MutS, ответственного за узнавание «мисматчей» и «инсерций». Также отмечено, что нечетко указано: кем выполнен фрагмент работы «Комплементационный тест».

В отзыве на автореферат к.б.н. Абрамова С.М. замечаний нет.

В отзыве на автореферат к.б.н. Каменского П.А. замечаний нет.

В отзыве на автореферат к.б.н. Бойко К.М. отмечается, что к недостаткам представленного автореферата следует отнести отсутствие описания использованных методов, которые, однако, в полной мере отражены в основном тексте диссертации.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что Носкин Л.А. и Кубарева Е.А. являются известными в мире специалистами в изучении системы репарации ДНК, а также ДНК-белковых взаимодействий. Это подтверждается наличием у оппонентов большинства публикаций по данным темам. Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН является авторитетным центром по исследованию репарации ДНК, а также изучению взаимодействий белков с различными структурами ДНК.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

идентифицирован и охарактеризован белок *M. gallisepticum*, способный специфически связывать ДНК, содержащую неправильно спаренные нуклеотиды;

разработана оригинальная методика очистки мисматч-связывающих белков; произведена *in silico* реконструкция системы репарации ДНК;

предложена гипотетическая модель репарации ДНК, содержащей ошибочно-спаренные нуклеотиды;

найлены новые, ранее не аннотированные, потенциальные участники системы репарации;

показана экспрессия генов, кодирующих участников репарации ДНК, на транскрипционном и белковом уровнях;

определена количественная представленность транскриптов на одну клетку;

проведен протеомный анализ белков, участвующих в репарации ДНК;

проведено транскрипционное и протеомное профилирование *M. gallisepticum* в условиях стрессовых воздействий.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что: исследована система репарации у бактерии с минимальным геномом. Данная бактерия в ходе дегенеративной эволюции утратила большую часть генов, присутствующих у непаразитических микроорганизмов, в том числе генов, ответственных за репарацию ДНК. Исследование систем репарации ДНК у такой «минимальной» клетки дает возможность выявить новые, ранее не известные, но при этом фундаментальные механизмы поддержания геномной стабильности.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

микоплазмы являются паразитами человека и сельскохозяйственных животных, изучение системы репарации ДНК, как участника системы генерирования устойчивости к антибиотикам имеет практическую значимость для здравоохранения и сельского хозяйства. Полученные данные могут быть использованы для создания новых антимикоплазменных препаратов, с учетом специфики организации микоплазм.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

полученные Горбачевым Алексеем Юрьевичем основные научные результаты основаны на экспериментальных данных, обоснованы и соответствуют современным представлениям о функционировании бактериальной клетки. Используемые методики исследования и проведенные расчеты были корректны. В результате проделанной работы разработана новая методика поиска белка, специфически связывающего поврежденную ДНК, с использованием технологии двумерного электрофоретического разделения белкового экстракта. Для определения количественной представленности мРНК в клетках *M. gallisepticum* была использована методика капельно-

25 сентября 2014 года