

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук
Агапова Алексея Александровича
на тему: «Роль Gre-подобных факторов бактерий рода *Deinococcus* в регуляции работы
РНК-полимеразы»
по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

Транскрипция – это процесс, обуславливающий передачу генетической информации потомству во всех живых организмах. Социально значимыми являются исследования процессов транскрипции как в клетках бактерий, встречающихся повсеместно, так и в клетках эукариот. Сбои в работе транскрипционной машины могут вызывать мутации в генах организма и, соответственно, его гибель. Поэтому необходимость детального изучения факторов, обуславливающих точность и эффективность передачи информации с ДНК-матрицы в процессе синтеза РНК в различных видах бактерий, не вызывает сомнения. Большую важность представляет исследование стрессоустойчивых бактерий, например, основного объекта данного исследования бактерии *Deinococcus radiodurans*, как с точки зрения поиска путей воздействия на них, так и с точки зрения понимания механизмов этого необычного явления. Однако регуляция транскрипции генов организмов, устойчивых к радиации, обезвоживанию и окислительному стрессу только начинает изучаться. Работа Агапова А.А. направлена на всесторонний анализ влияния ранее неисследованных Gre-подобных факторов бактерий рода *Deinococcus* (Gfh-факторы *D. radiodurans* и *D. peraridilitoris*) на работу РНК-полимеразы (РНКП) на всех стадиях транскрипции – в процессе инициации, элонгации и терминации, что расширяет границы наших представлений о клеточных процессах. Поэтому тема диссертации Агапова А.А., безусловно, актуальна.

Диссертационная работа Агапова А.А. является закономерным продолжением масштабных исследований транскрипционного аппарата бактерий, проводимых в лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ИМГ РАН, возглавляемой проф. А.В. Кульбачинским. В комплексном исследовании, выполненном диссертантом, впервые показано, что Gfh-факторы *D. radiodurans* не влияют на расщепление РНК в смещенных транскрипционных комплексах. В то же время в присутствии ионов Mn^{2+} Gfh-факторы совместно с белком NusA стимулируют транскрипционные паузы, в том числе вызванные повреждениями в ДНК, и способствуют диссоциации элонгационных комплексов транслоказой Mfd. Это открытие, сделанное Агаповым А.А., представляет большой интерес, поскольку позволяет глубже понять взаимосвязь двух ключевых клеточных

процессов – транскрипции и репарации. Повышение эффективности терминации транскрипции и диссоциации комплексов РНК-полимеразы с поврежденными ДНК-матрицами под действием Gfh-факторов должно предотвращать конфликты РНКП с реплисомой, что может иметь ключевое значение для сохранения целостности ДНК и поддержания стабильности генома. Таким образом, научная новизна результатов, полученных диссертантом, не вызывает сомнений.

Практическая значимость работы Агаповой А.А. заключается в демонстрации эффективности использования специально сконструированных систем, состоящих из оптимально подобранных коротких фрагментов РНК и ДНК, для изучения всех этапов транскрипции в различных условиях, а также адаптации метода «молекулярный маячков» для анализа взаимодействий РНКП *D. radiodurans* с промоторами и исследования кинетики инициации транскрипции. Кроме того, ингибиторы РНКП, по механизму действия аналогичные Gfh-белкам, в перспективе могут использоваться в качестве антибактериальных агентов.

Диссертация Агапова А.А. состоит из четырех основных глав. Обзор литературы содержит два раздела. В первом из них описываются свойства бактерии *D. radiodurans*, особенности регуляции экспрессии генов ней, а также дается краткое напоминание о типах репарации ДНК в клетках и механизмах их устойчивости к окислительному стрессу. Во втором разделе освещаются основные этапы процесса транскрипции в бактериях. Особый интерес представляет второй подраздел этого раздела, где проведен подробный анализ структуры и функций факторов транскрипции, взаимодействующих с РНКП через вторичный канал. Следует отметить, что на основе материала, вошедшего в обзор, автором подготовлена обзорная статья, опубликованная в журнале «Биохимия».

В главе «Материалы и методы» подробно описаны используемые в работе методики. В своих исследованиях Агапов А.А. умело сочетал классические биохимические и молекулярно биологические приемы (например, выделение белков, сайт-направленный мутагенез, проведение транскрипции *in vitro*) с методами биоорганической химии (метод «молекулярных маячков»), активно пользовался инструментальными методами анализа (различные виды гель-электрофореза, спектрофлуориметрия).

Глава «Результаты работы» состоит из девяти разделов, в которых изложено решение поставленных задач. В них убедительно показано, что Gfh-факторы *D. radiodurans* не оказывают значимого влияния ни на стабильность инициаторных комплексов РНКП с промотором, ни на переход от стадии инициации к стадии элонгации. На стадии элонгации транскрипции Gfh-факторы *D. radiodurans* стимулируют действие РНКП только в присутствии ионов Mn^{2+} . Этот эффект объясняется избирательным увеличением Gfh-

факторами пауз транскрипции и значительным влиянием на терминацию. Белок NusA существенно повышает эффективность этих процессов. Агаповым А.А. проанализирована точность и эффективность работы РНКП на ДНК-матрицах, содержащих наиболее распространённые дефекты нуклеотидов. Результаты свидетельствуют о том, РНКП *D. radiodurans* сама по себе не проявляет особых свойств, которые могли бы объяснить высокую стрессоустойчивость *D. radiodurans*. Установлено, что Gfh1-фактор *D. radiodurans* способствует появлению транскрипционных пауз, образующихся на поврежденных участках ДНК, и более быстрой диссоциации элонгационных комплексов под действием белка Mfd, сопряженного с системой эксцизионной репарации нуклеотидов. Также Агапов А.А. описал Gfh-факторы бактерии *D. peraridilitoris*, демонстрирующие схожие транскрипционные свойства с Gfh-факторами *D. radiodurans*. Это свидетельствует о важной роли данной группы транскрипционных факторов в регуляции активности РНКП у стрессоустойчивых бактерий рода *Deinococcus*.

В главе «Обсуждение результатов» суммируются полученные данные, сравнивается функционирование Gfh-факторов *D. radiodurans* с Gfh1-фактором *T. thermophiles* и Gre-факторами, и, что особенно ценно, делаются попытки объяснить причины наблюдаемых явлений. Замечательно также, что высказанные диссертантом в этой главе гипотезы открывают широкие перспективы для дальнейших исследований.

Диссертационная работа Агапова А.А. выполнена на высоком научном уровне, тщательно продумана и детально описана. Достоверность результатов не вызывает сомнений. Выводы работы соответствуют полученным результатам, автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации.

По существу работы замечаний не имеется. Однако следует отметить некоторые недочеты, связанные с написанием работы.

1) Глава «Обзор литературы».

- В подразделе 2.1.3.3. в ряде случаев вместо написания марганца и железа в ионной форме указывается химический элемент.

- Обзор литературы выглядел бы более завершённым при наличии небольшого заключения в конце этой главы, соединяющего материал, изложенный в разных разделах.

2) Глава «Материалы и методы».

- В тексте полностью отсутствуют сокращения единиц времени: минута (мин), секунда (с), часы (ч).

- В работе используются фрагменты как ДНК, так и РНК (см., например, таблицу 3.3 стр. 67 и рис. 4.4., 4.6, 4.13, 4.16, 4.17 в главе «Результаты»). Согласно правилам в случае смешанных систем фрагмент ДНК должен быть заключен в скобки и перед ним должен

стоять индекс d – «дезокси». Обозначение r перед рибонуклеотидами или олигорибонуклеотидами в таких случаях не ставится.

- В таблицах 3.2 и 3.4 указываются фрагменты ДНК, содержащие модифицированные нуклеозиды. В приведенных олигодезоксирибонуклеотидах можно было бы указать существующие условные обозначения таких нуклеозидов, например, 8-оксогуанозин – 8oxoG, тимидингликоль (Tgl) и т.д. Однако автор непосредственно в последовательности нуклеотидов приводит названия модифицированных гетероциклических оснований. В этом случае надо было указать названия нуклеозидов (вместо 8-оксогуанина должен быть 8-оксогуанозин, вместо тимингликоля – тимидингликоль и т.д.).

- В подразделе 3.6.13 «не расшифровано» как именно определяли точность работы РНКП при транскрипции поврежденных матриц.

- В разделах 3.6.14 и 3.6.15 (таблицы 3.6. и 3.7) при проведении реакций на ДНК-матрицах, содержащих апуриновый/апиримидиновый участок (АП-сайт) и тимидингликоль использовались разные температуры – 25 и 30 °С. Автор не поясняет, чем вызвана эта разница.

- В работе нет указания на то, каким образом вводился АП-сайт в ДНК (было ли введено устойчивое производное тетрагидрофурана при автоматическом синтезе или АП-сайт получали в ходе ферментативного выщепления урацила из ДНК, содержащей dU).

3) Глава «Результаты».

- На некоторых рисунках в диссертации (рис. 4.2 стр. 76, рис. 4.4. стр. 83, рис. 4.14 стр. 96, рис. 4.19 стр. 104) и на соответствующих рисунках в автореферате вместо ионов магния и марганца указаны химические элементы.

- На рис. 4.13 стр. 95 даны структурные формулы нуклеозидов, а названия даны для гетероциклических оснований (см. аналогичное замечание выше).

4) В тексте диссертации имеется ряд неудачных выражений, например, «делетанты» (делеционные мутанты), «марганцевые комплексы» (комплексы ионов марганца), «фосфоэстеразная активность» (фосфатазная активность), «гепариновая хроматография» (аффинная хроматография на гепарин-сефарозе), «обессоливающая колонка» (колонка для гель-фильтрации) и т.д.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.03 – «молекулярная биология» (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете

имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Агапов Алексей Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

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

Кубарева Елена Александровна

2 ноября 2018 г.

Контактные данные:

тел.: +7(495)939-54-11, e-mail: kubareva@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 02.00.10 – «Биоорганическая химия»

Адрес места работы:

119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 40
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
Отдел химии нуклеиновых кислот
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
образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
академик РАН

