

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Евсютиной Дарьи Викторовны
на тему: «Регуляция передачи генетической информации у бактерий
с редуцированным геномом»
по специальности 1.5.3 (03.01.03)– «Молекулярная биология»

Актуальность и новизна исследования

Диссертационная работа Евсютиной Д.В. посвящена выяснению механизмов регуляции передачи генетической информации у бактерий с редуцированным геномом. Актуальность этой тематики не вызывает сомнений по крайней мере по двум причинам. Во-первых, процесс передачи генетической информации является одним из важнейших, определяющих процессов в живых организмах, связывающим между собой ДНК, РНК и белки. Соответственно исследование механизмов регуляции этого процесса в принципе важно для понимания того, как функционирует живой организм в различных условиях. Во-вторых, изучение передачи генетической информации у организмов с уменьшенным размером генома может помочь выяснить основные принципы организации и функционирования клетки, необходимые и достаточные для ее жизнедеятельности. В качестве объекта исследования в работе Евсютиной Д.В. выбрана примере *Mycoplasma gallisepticum* S6, представитель класса Mollicutes, Mollicutes обладают самым маленьким по размеру геномом среди известных организмов, способных к самостоятельной репликации своего генетического материала. Основное внимание Евсютина Д.В. сконцентрировала на изучении процесса регуляция транскрипции, т.е. передачи информации от ДНК к РНК, и несколько менее подробно исследовала механизм регуляции трансляции, т.е. передачи информации от мРНК к белку.

В результате проделанной работы на основании аннотированных функциональных доменов белков *M. Gallisepticum* Евсютиной Д.В. удалось обнаружить 10 потенциальных факторов регуляции транскрипции, экспериментально показать, что 4 из них действительно являются регуляторами транскрипции и определить их сайты связывания в геноме. Кроме того, диссертантом был идентифицирован новый белок, названный ParX, способный связываться с промоторной областью гена *parA* и репрессировать его экспрессию. При исследовании регуляции трансляции Евсютиной Д.В. удалось показать, что под действием теплового стресса рибосомы проявляют избирательность по отношению к определенным мРНК. Так оказалось, что рибосома избирательно транслирует мРНК, кодирующие шапероны, иммуноглобулин связывающие белки и белки, участвующие в делении клетки; также был обнаружен повышенный уровень трансляции нескольких белков с неизвестной функцией. Полученный результат позволяет предположить, что, поскольку *M. gallisepticum* обычно обитают в организме птиц, повышение температуры является признаком воспаления в организме хозяина и, соответственно, для микоплазмы сигналом для борьбы с денатурацией собственных белков (с помощью шаперонов), активации системы избегания иммунного ответа хозяина (с помощью IgG-связывающих белков) и запуска активного размножения.

Структура и объем диссертации

Диссертация Евсютиной Д.В. построена по традиционной схеме и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения, заключение, выводы, список литературы и приложение. Работа изложена на 145 страницах, включает 50 рисунков и 6 таблиц. Содержание диссертации полностью соответствует специальности. Результаты работы представлены в 8

статьях, опубликованных в международных рецензируемых журналах. В автореферате приводится также информация об апробации работы на международных конференциях. Публикации по итогам работы и автореферат в полной мере отражают основное содержание диссертации.

Общая характеристика содержания диссертационной работы

Во введении очень четко и конкретно описаны актуальность исследования, его научная новизна, практическая ценность, а также цель и задачи диссертационной работы. Обзор данных литературы состоит из трех основных разделов, тесно связанных с тематикой всей работы. Первый раздел посвящен описанию основных механизмов регуляции экспрессии генов у бактерий, во втором разделе наиболее широко используемые методы поиска регуляторов экспрессии и их мишеней в геноме. Наконец, в третьем разделе обзора рассматриваются особенности регуляции передачи генетической информации у бактерий с редуцированным геномом класса Mollicutes, на примере микоплазм. Обзор написан хорошим литературным языком, с интересом читается и помогает читателю лучше понять выбор направления исследований и значимость проделанной диссертантом работы. Можно, однако, отметить излишнюю краткость в изложении литературных данных. Наверное, стоит несколько расширить материал обзора, возможно, привести наиболее распространенные или наиболее необычные механизмы регуляции и после этого опубликовать обзор.

В разделе «Материалы и Методы» четко и подробно описаны многочисленные методики, использованные в работе. Необходимо сразу отметить, что Евсютина Д.В. удачно сочетала в своей работе как биоинформатические методы, так и широкий спектр самых современных методов молекулярной и клеточной биологии: ПЦР, различные варианты трансформации бактериальных клеток, генетическую инженерию,

CRISPR-интерференцию, выделение ДНК и РНК из клеток, получение рекомбинантных белков, торможение ДНК в геле.

Раздел «Результаты и обсуждение» по объему представляет собой почти половину всей диссертации. На первом этапе был произведен биоинформатический поиск предполагаемых факторов регуляции транскрипции, а также оценено их распределение среди 50 представителей класса Mollicutes. На основе сравнения белковых последовательностей у выбранных бактерий были составлены кластеры ортологов и для участников кластера проведен поиск функциональных доменов. Предполагаемые факторы регуляции транскрипции были отобраны по наличию такого распространенного структурного элемента ДНК-связывающих белков, как мотив спираль–поворот–спираль (НТН). Согласно найденным доменам и аннотации был отобран 91 белок, способный связываться с ДНК, отфильтровав белки с известной функцией, Евсютина Д.В. получила 10 потенциальных факторов транскрипции. Среди них только четыре белка – HrcA, MraZ, WhiA и YebC были представлены у более, чем 70% видов Mollicutes. Белок HrcA оказался единственным фактором регуляции транскрипции *M. gallisepticum* с известным механизмом действия. Сайты связывания MraZ, WhiA и YebC у Молликут оставались неизвестны. Для дальнейшей экспериментальной работы были выбрали консервативные белки MraZ и WhiA, а также специфичные для *M. gallisepticum* белки Xre и Fur.

Далее для каждого из выбранных 4-х потенциальных регуляторов транскрипции диссертант тщательно определила сайты их связывания в геноме исследуемой микоплазмы и экспериментально доказала, что эти белки действительно являются регуляторами транскрипции. В частности, оказалось, что только белок MraZ является активатором транскрипции. Он связывает последовательность, состоящую из трех прямых повторов, разделенных спейсером в три нуклеотида, в

промоторной область генов кластера деления (ген *mraZ* является первым геном этого кластера). При повышении уровня этого белка в клетке активируется транскрипция генов кластера деления, что отражается на фенотипе клеток микоплазмы – клетки удлиняются, образуя филаменты. Остальные три исследуемые в работе белка оказались репрессорами транскрипции. В качестве основного метода при определении сайтов связывания белков *MraZ*, *WhiA*, *Xre* и *Fur* в геноме *M. gallisepticum* Евсютина Д.В. использовала классический метод торможения в геле. Однако при этом она не ограничилась только анализом связывания белков с нативными последовательностями промоторов, но и проверила специфичность взаимодействия белка с найденной последовательностью ДНК, для чего вносила мутации в разные позиции сайта и оценивала эффективность связывания белка с мутантами ДНК. Для белка *MraZ* была также определена стехиометрия ДНК-белкового комплекса с использованием эксклюзионной хроматографии и на основании полученных данных предложена модель взаимодействия белка *MraZ* с ДНК, в которой мономеры белка образуют кольцо из восьми субъединиц на каждом повторе сайта связывания.

Следующим этапом работы Евсютиной Д.В. был поиск и валидации новых мишеней регуляторов транскрипции в геноме *M. Gallisepticum*. Для оценки влияния генетических элементов на экспрессию репортерного гена *egfp* был разработан вектор на основе транспозона Tn4001. С помощью данной системы найден набор генов *M. gallisepticum*, экспрессия которых зависит от влияния регуляторов. К таким генам относятся - *uvrB*, *parA*, *rplJ*. Изучая промоторные области гена *parA* у разных микоплазм диссертант обнаружила консервативные мотивы с несовершенными повторами. По результатам эксперимента по обогащению фракции растворимых белков *M. gallisepticum* белками, способными связываться с областью, содержащей эти повторы, был

идентифицирован белок с неизвестной функцией, чей ген располагается после гена *parA* в одном с ним опероне. Этот белок был назван *parX* и было показано, что он способен связываться с промоторной областью собственного оперона и репрессировать его экспрессию.

В последнем разделе работы описаны результаты, полученные ею при исследовании механизмов регуляции трансляции при тепловом стрессе. Для этого проводился анализ фракции мРНК, связанной с рибосомами, по отношению к общему количеству мРНК в клетке. Оказалось, что тепловой стресс вызывает значительное увеличение транскрипционного шума в популяции *M. gallisepticum*, при этом транслируются преимущественно мРНК, кодирующие белки, обеспечивающие адаптивный ответ на стресс, а именно: шаперон *clpB*; три иммуноглобулин-связывающих белка; белки, участвующие в делении клетки *MraZ*, *MraW*, *FtsZ*. Было также идентифицировано несколько белков с неизвестной функцией: *GCW_03070*, *GCW_02935*. Нет сомнений, что дальнейшие исследования будут направлены на тщательное описание детерминант эффективности трансляции у микоплазм с целью использования для нужд синтетической биологии.

Необходимо подчеркнуть, что все указанные выше результаты являются оригинальными и ярко отражают новизну данной работы. Работа Евсютиной Д.В. представляет собой целостное и завершённое научное исследование, выполненное на очень высоком экспериментальном уровне. Результаты работы изложены чётко и ясно. Сделанные выводы обоснованы и подтверждаются полученными экспериментальными данными. Хочется также отметить высокое качество не только экспериментальной работы диссертанта, но и подготовки диссертации. Вся работа хорошо структурирована, снабжена достаточно четкими и аккуратными рисунками.

Замечания и вопросы к работе

Тем не менее, к работе есть некоторые вопросы и замечания.

Так в частности, в обзоре литературы рисунок 1.1. адаптирован из англоязычной статьи и текст на рисунке неправильно переведен: labeled DNA template переведено как «меченый ДНК зонд». Это мешает правильному пониманию принципа метода, поскольку создается впечатление, что ферментативному расщеплению подвергается не комплекс меченой ДНК с белком, а какой-то непонятный меченый зонд. Также в разделе «Методы поиска регуляторов и их мишеней» обзора литературы наряду с прочими методами упомянут метод SELEX, однако никак не отмечено, что этот метод с равной вероятностью может определить как истинную мишень регулятора, так и аптамер к нему, что делает интерпретацию полученных этим методом результатов достаточно сложной.

В разделе, посвященном изучению взаимодействия белка MraZ со своей мишенью указано, что «наибольший вклад в специфичность взаимодействия вносит вторая тройка нуклеотидов повтора сайта связывания». Однако диссертант никак не объясняет тот факт, что дуплекс Mut5, содержащий замены в этой тройке двух модулях, связывается с белком не на много хуже, чем природная мишень и существенно лучше, чем дуплекс Mut4, в котором замены находятся в первой тройке нуклеотидов. Далее при определении стехиометрия ДНК-белкового комплекса методом эксклюзионной хроматографии Евсютина Д.В. показывает, что с ДНК длиной в 40 п.н. связывается 24 мономера белка MraZ. Однако на рис. 1 в автореферате (рис. 3.3 в диссертации) видно, что 500 нМ ДНК-дуплекс дикого типа практически полностью связан в комплексе с 20 нМ белком MraZ, т.е. белок связывает ДНК, присутствующую в 25-ти кратном избытке. Хотелось бы понять, почему два метода дают прямо противоположный результат.

Общее замечание касается утверждений диссертанта о том, что изучаемый белок связывает ту или иную ДНК лучше или хуже. Такие утверждения стоит делать только после определения констант диссоциации или ассоциации ДНК-белковых комплексов, но никак не по одной точке на геле.

Не очень удачный рис. 11 в автореферате (рис. 3.23 в диссертации). На нем представлены результаты анализа влияния АТФ и АДФ на способность WhiA связывать специфический ДНК-субстрат *rpsJ*_WT и неспецифическую ДНК *plsC*. В работе указывается, что добавление различных концентраций АТФ не оказывало существенного влияния на связывание WhiA с неспецифическим субстратом *plsC*. При этом на левом геле действительно нет связывания WhiA с *plsC*, а правом геле присутствуют полосы на уровне ДНК-белкового комплекса. Надо добавить, что выражение неспецифический субстрат не имеет большого смысла, да и вообще использование термина «субстрат» по отношению к белку, который не является ферментом, неправильно. Лучше использовать термин «лиганд».

Как уже отмечено выше, диссертации Евсютиной Д.В. написана хорошим литературным языком и хорошо структурирована. Однако в ней присутствуют неудачные или плохо сформулированные выражения и некоторые ошибки, хотя их число крайне мало. Так, вместо рис. 3.19 Б, скорее всего должен быть указан рис. 3.20. При написании последовательностей ДНК диссертант иногда использует нетипичные для нуклеотидов обозначения W, K, M или N, не указывая, что они значат. Фраза «Экспериментальное подтверждение ДНК-связывающих свойств белков-кандидатов оценивали с помощью электрофореза в нативных условиях» явно чересчур «экспериментальна». Выражение «При действии теплового стресса рибосомы проявляют избирательность в отношении к мРНК» лишено большого смысла, поскольку рибосомы всегда

избирательно взаимодействуют именно с мРНК. Непонятна фраза «При добавлении длинных последовательностей только в до или только после промотора, не ведет к значимому изменению экспрессии репортерного гена». Из предложения «участки до и после промотора гена *rplJ* содержат сайты связывания активатора, который действует как энхансеры у эукариот» невозможно понять, что действует как энхансеры, участки до или после промотора или активатор.

Заключение

Вместе с тем, указанные недочеты никоим образом не умаляют значимости диссертационного исследования и не снижают общего высокого уровня работы, которая, несомненно, является высококлассным научным исследованием. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.3 (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 Евсютина Дарья Викторовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 (03.01.03) – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

заведующий отделом химии нуклеиновых кислот

Научно-исследовательского института
физико-химической биологии
имени А.Н.Белозерского
МГУ имени М.В.Ломоносова
доктор химических наук, профессор

/Готтих М.Б./

21.11.2022 г.

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 939-54-07, e-mail: gottikh@belozersky.msu.ru,

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

02.00.10– Биоорганическая химия

Адрес места работы:

119234, г. Москва, Ленинские горы, д.1, строение 40,
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова,
Отдел химии нуклеиновых кислот,
Тел.: +7 (495) 939-53-59; e-mail: fxb@genebee.msu.ru

Подпись Готтих М.Б. заверяю:

Директор НИИ физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского
МГУ имени М.В.Ломоносова
академик РАН
/В.П.Скулачев/