

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 – «Молекулярная биология»

Диссертационная работа Д.В. Евсютиной посвящена исследованию регуляции передачи генетической информации у бактерий с редуцированным геномом. Бактерии, такие как представители класса *Mollicutes*, несмотря на наличие существенно редуцированного генома, сохранили широкие адаптивные способности, реализацию которых сложно себе представить без вовлечения регуляторов экспрессии генов. В тоже время у малликот репертуар потенциальных регуляторов экспрессии генов также существенно редуцирован, а наши знания о механизмах регуляции экспрессии генов малликот очень ограничены. Таким образом, не возникает никаких сомнений в том, что исследование регуляции передачи генетической информации у бактерий с редуцированным геномом чрезвычайно актуально и представляет не только исключительно фундаментальный интерес, но имеет и существенный прикладной аспект в плане выявления набора механизмов передачи генетической информации, необходимого для минимального обеспечения жизнедеятельности клетки, которые в перспективе смогут быть использованы, например, при создании искусственных живых систем.

В работе решались следующие задачи: исследовался геном *M. gallisepticum* на наличие генов потенциальных факторов регуляции транскрипции (ТФ); проводился поиск генов-мишеней потенциальных транскрипционных факторов; экспериментально подтверждались выявленные сайты связывания ТФ-ов; разрабатывался способ валидации выявленных новых генов – мишеней регуляторов; используя ответ микоплазмы на тепловой стресс, рассматривалась возможность связывания

рибосомы с мРНК, как возможный механизм регуляции передачи информации от мРНК к белку.

Представленная работа логична по своему замыслу и изложению и соответствует классической структуре диссертационных работ. Она состоит из введения, трех основных глав, заключения, выводов, списка использованной литературы (163 источника) и приложения, в которое вынесены дополнительные материалы. Работа занимает 145 страниц, содержит 50 рисунков и 6 таблиц.

Обзор литературы постепенно вводит читателя в тематику передачи генетической информации с упором на особенности процессов у прокариотов. Кроме того, часть литературного обзора посвящена описанию применяемых биоинформатических и экспериментальных методов для поиска регуляторов и их мишеней. Логично, что заключительный раздел литературного обзора посвящен особенностям регуляции передачи генетической информации у бактерий с редуцированным геномом класса *Mollicutes* на примере микоплазм.

Раздел Материалы и методы представляет подробное описание методик, применяемых в ходе выполнения работы. Нельзя не отметить, что набор методик производит очень сильное впечатление, т.к. в разделе представлены все основные методы молекулярной биологии, генетической инженерии, включая методы редактирования геномов, и биоинформатики.

В ходе выполнения экспериментальной части работы, описанной в разделе Результаты и обсуждение, был проведен поиск потенциальных факторов регуляции транскрипции у *M. gallisepticum*, определены сайты связывания для выявленных ТФ-ов, на основе репортерного гена *eGFP* создана и протестирована система тестирования для ТФ-ов и их генов-мишеней, а также проведен анализ фракции мРНК, связанной с рибосомами, в норме и после теплового шока. Следующее за экспериментальной частью Заключение подводит итоги и еще раз фокусирует внимание на наиболее значимых результатах работы.

Диссертационная работа написана понятным языком, выверена, но содержит некоторое количество опечаток. Экспериментальная часть выполнена на высоком научном-методическом уровне с использованием современных методов молекулярной биологии, биохимии, генетической инженерии и биоинформатики. Интерпретация полученных результатов логична, аргументирована, научно обоснована и не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Д.В. Евсютиной не вызывает существенных замечаний. Однако следует отметить некоторые моменты.

Литературный обзор

Часть литературного обзора посвящена описанию существующих методик. Однако эти описания, как правило, дают лишь общее представление о методах. Как мне кажется, в литературном обзоре описание технологий, как минимум, для chip-seq могло бы быть приведено более подробно и с учетом последних достижений.

В Литературном обзоре в последнем абзаце сделана попытка связать этот раздел с последующими главами диссертации. Однако, как мне кажется, проработке такой логической связки следовало бы уделить большее внимание.

Как мне кажется, литературный обзор мог бы быть лучше иллюстрирован. Из 50 рисунков, входящих в диссертацию, лишь 4 иллюстрируют этот раздел.

Материалы и методы

В разделе Материалы и методы отсутствует отдельная глава, посвященная использованным в работе материалам и реагентам. И использованные материалы и реагенты упоминаются лишь в разделах, посвященных описанию отдельных методов. Однако фирмы-производители указаны для абсолютного меньшинства упоминаемых материалов и реагентов, а также не для всех приборов.

Именно в данном разделе встречается наибольшее число неудачных оборотов (см. примеры ниже).

Результаты и обсуждение

Автор сам признает, что использованные алгоритмы поиска потенциальных факторов регуляции транскрипции (ТФ) у *Mycoplasma gallisepticum* на основании сходства первичной структуры не являются идеальными. Было бы интересно видеть оценочные суждения автора о том, какое количество ТФ использованные алгоритмы выявить не позволили.

Общие замечания

Как мне кажется, названия глав могли бы быть более информативны. Например, из оглавления диссертации нельзя понять, что в работе исследовались механизмы рестрикции-модификации, а также эффекты, вызываемые тепловым шоком.

Местами латинские названия не выделены наклонным шрифтом.

Во многих местах в отношении РНК U обозначен, как T.

Опечатки и неудачные обороты: Стр. 19 расщепления нуклеотидов; Стр. 19 позиции ДНК, которые защищены от расщепления; Стр. 19 Анализ сдвига электрофоретической подвижности; Стр. 20 метод фупринтинга; Стр. 22 пришит белок; Стр. 30 экспрессия участников которые, как правило, находится под регуляцией; Стр. 30 изученных на *E. Coli*; Стр. 31 сайте начала транскрипции; Стр. 31 промоторные области были извлечены; Стр. 33 делили культуру на две пробирки; Стр. 33, 39 Выделение плазмидной ДНК щелочным гидролизом; Стр. 33 Очищали плазмиду коммерческим набором; Стр. 34 Получение чистого препарата целевых белков; Стр 37 В качестве кофакторов для белка WhiA были протестированы нуклеотиды; Стр. 41, 42 и далее для эндонуклеаз: *ApaI*, *PaeI* и *XbaI* (должен использоваться наклонный шрифт: *ApaI*, *PaeI* и *XbaI*); Стр. 45 измеряли концентрацию флуориметрически на флуориметре; Стр. 52 Белок *MraZ* *M. gallisepticum* был получен с рекомбинантной молекулы ДНК в кишечной палочке.

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 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:

доктор биологических наук, доцент,
Директор Института молекулярной медицины,
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования Первый Московский государственный медицинский
университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения
Российской Федерации (Сеченовский Университет)

ЗАМЯТНИН Андрей Александрович

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 622-98-43, e-mail: zamyatnin_a_a@staff.sechenov.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:

03.01.03 – Молекулярная биология, 03.02.02 – Вирусология



Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Институт молекулярной медицины. Тел.: +7 (495) 609-14-00; e-mail: zamyatnin_a_a@staff.sechenov.ru