

Отзыв
официального оппонента
на диссертацию Дмитрия Михайловича Байтина
«Молекулярные механизмы регуляции активности белка RecA»,
представленную к защите на соискание ученой степени доктора
биологических наук

Диссертационная работа Байтина Д. М. является чрезвычайно актуальным исследованием, тема которого заслуженно привлекает внимание огромного количества учёных. О гене и белке RecA написаны многие тысячи научных статей и книг. Некоторые из них называются так: «RecA – ген эволюции» или «RecA белок: структура, функция и роль в рекомбинационной репарации ДНК» или «Биохимические взаимодействия белков RecF, RecO, и RecR с RecA». Сказанное свидетельствует, во-первых, о пристальном внимании учёных к объекту диссертационной работы и, во-вторых, об исключительной сложности проблемы. Совершенно очевидно, что труд, представленный к защите Д.М. Байтиным, является фундаментальным, содержащим различные аспекты функционирования белка RecA от данных генетического анализа и регуляции его активности до биоинформационной работы по построению модели структурно-функциональной организации нуклеопротеинового комплекса.

Гомологическая рекомбинация является одной из важнейших систем прокариотической клетки. Белок RecA является центральным компонентом гомологической рекомбинации и рекомбинационной репарации ДНК. В зависимости от типа повреждения ДНК и интенсивности стрессового воздействия на бактерию, белок RecA взаимодействует с разными белками регуляторами. Некоторые из этих регуляторов функционируют независимо от RecA, другие, являясь частью SOS регулона, корректируют действия филамента RecA. Изучение свойств отдельных компонентов комплексов и их взаимодействий дает возможность оценить вклад в рекомбиногенность

отдельных медиаторов и оценить потенциал рекомбиназной активности самого RecA. Необходимо отметить, что особую актуальность данной работе придает возможность, в конечном итоге, сформулировать ряд выводов, способствующих созданию молекулярной модели функционирования RecA в условиях гипер- либо гипорекомбинации.

Общая характеристика работы. Диссертационная работа построена по классической схеме и содержит все необходимые разделы – введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения. Несмотря на относительную компактность (несколько более 200 страниц) диссертации, основные разделы описаны достаточно подробно. Объемный и весьма подробный раздел обзора литературы состоит из нескольких глав, которые посвящены описанию структурно-функциональной организации самого белка RecA и вспомогательных систем регуляторных белков. Заключительная глава литературного обзора посвящена разработкам, имеющим потенциальный выход на практическое применение в сфере антибактериальной терапии. Всего в диссертации имеется 301 ссылка на цитируемые литературные источники, примерно половина из которых, опубликована после двухтысячного года.

В разделе «Материалы и методы» изложены многочисленные современные методы молекулярной биологии и биохимии, позволившие автору эффективно решить поставленные задачи. Методы генетического анализа представлены классическим подходом, усовершенствованным для конъюгационной рекомбинации еще В.А. Ланцовым и С.Е. Бреслером, но сохранившим свою ценность для выполнения ряда задач.

Раздел «Результаты и обсуждения» содержит подробное описание выполненных экспериментов и их анализ. Изложение результатов диссертант начинает с данных генетического анализа. Бактериальная конъюгация является наиболее удобной модельной системой, в рамках которой удастся

количественно оценить значение исследуемых генов в гомологической рекомбинации. Измерение частоты рекомбинационных обменов на единицу длины генома позволяет выделить ряд вариантов RecA, которые существенно отличаются по своей рекомбинационной активности от дикого типа. Поскольку в ходе бактериальной конъюгации SOS-ответ подавлен специализированным аппаратом клетки, это позволяет учитывать эффект каждого гена отдельно от действия остальных медиаторов рекомбинации. В работе оценивается генетический эффект важнейших регуляторных генов и более чем двух десятков вариантов белка RecA, с аминокислотными заменами.

Раздел, посвященный биохимическим активностям RecA, насыщен богатым экспериментальным материалом и производит хорошее впечатление, как своим объемом, так и разнообразием использованных методик. Исследуются свойства, определяющие активность RecA филамента на молекуле одноцепочечной ДНК, сродство к молекуле АТФ, и к ДНК. Найдена главная особенность, объединяющая все гиперрекомбиногенные RecA – способность рекомбиназ ускоренно образовывать комплексы в присутствии белка SSB. Однако принципиально новое утверждение Д.М. Байтина заключается в том, что рекомбиногенность может быть следствием синаптной активности RecA филамента. С помощью специального теста доказано, что вариант белка RecAD112R активнее осуществляет поиск и переключение спаренности с гомологичной двуцепочечной ДНК, чем вариант белка дикого типа. Это доказательство представляет собой важный вклад диссертанта в рассматриваемую проблему. Одновременно решается задача функционирования механизма саморегуляции рекомбиногенного фенотипа бактерий. В частности, выявлены специфические мутации, которые подвержены селекции бактериальных клеток с обычным уровнем рекомбиногенности. Вероятно, такие мутации можно считать компенсаторными и играющими стабилизирующую роль. Эта интересная

находка позволяет диссертанту заключить, что возврат к исходному фенотипу обусловлен падением экспрессии RecA на фоне мутаций в регуляторных участках ДНК.

Специальный раздел посвящен модели функционирования регуляторного белка RecX. Данные касающиеся биохимических особенностей функционирования этого ингибиторного белка рассматриваются в контексте уже имеющихся результатов, полученных ранее международными научными группами. В соавторстве со специалистами в области компьютерного и молекулярного моделирования автором представлена модель нуклеопротеинового комплекса, включающего филамент RecA, молекулу RecX и оцДНК. С учетом биохимических данных был определен фрагмент белка RecX, который наиболее глубоко проникает в структуру RecA филамента, где интеркалирует с ДНК. С помощью специализированной программы этот пептидный фрагмент был модифицирован таким образом, что получил способность функционировать независимо, подавляя белок RecA. Данный результат не только расширяет представления о структурно-функциональном устройстве основного блокатора рекомбинации белка RecX, но, что немаловажно, создает предпосылки для создания нового класса антибактериальных соединений.

Недостатки работы очень немногочисленны. Можно отметить встречающиеся грамматические ошибки, особенно это относится к пунктуации. Некоторые обозначения рекомбиназ выполнены не единообразно. Например, RecA из *D.radiodurans* в различных параграфах обозначается как RecADr, RecAD.r, RecAD.rad.

Методика подсчета выживаемости клеток в зависимости от дозы УФ излучения приводится в главе «Материалы и методы» и одновременно дублируется под рисунком 28 и частично под рисунком 40.

В «Обзоре литературы» приведены исчерпывающие данные о функциональной роли регуляторных белков, но, возможно, стоило привести больше ссылок на ранние работы, посвященные генетическому анализу.

Указанные незначительные погрешности ни коей мере не снижают высокий уровень диссертационной работы. Результаты работы поражают своей глубиной, а представленные выводы соответствуют поставленным целям и задачам исследования. По материалам диссертации опубликовано достаточно публикаций, в том числе многие представлены в ведущих научных журналах, один из которых в авторитетном журнале *Nucleic Acids Research*. Представленная диссертация является важным научным исследованием.

Заключение. Полученные диссертантом результаты достоверны, выводы и заключения убедительны. Автореферат полностью передает основное содержание и выводы диссертации, обладает четкостью и последовательностью изложения.

В заключении следует констатировать, что диссертационная работа Байтина Дмитрия Михайловича «Молекулярные механизмы регуляции активности белка RecA», представленная к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, является великолепной научно-квалификационной работой. В диссертации на основании выполненных автором исследований разработаны положения, которые можно квалифицировать как крупное научное достижение в области молекулярных механизмов функционирования основного белка гомологической рекомбинации – белка RecA.

По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности результатов работа Дмитрия Михайловича Байтина соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени

доктора биологических наук, а ее автор безусловно заслуживает присуждения ему искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Главный научный сотрудник Лаборатории
молекулярной генетики микроорганизмов
Федерального бюджетного учреждения науки
«Федеральный научно-клинический центр
физико-химической медицины Федерального
Медико-биологического агентства»,
доктор биологических наук по специальности
03.01.03 – молекулярная биология,
профессор, член-корреспондент РАН

Г.Б. Смирнов

Подпись Смирнова Г.Б. заверяю

Ученый секретарь

ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

к.б.н.



Е.С. Кострюкова