



КАФЕДРА МИКРОБИОЛОГИИ И ВИРУСОЛОГИИ

«ПЕРВЫЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России)

ул. Льва Толстого, дом 6-8, Санкт-Петербург, 197022; тел.: (812) 338-70-49, e-mail:
microb_nauka@spb-gmu.ru vtetzy@yahoo.com

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. посвящена изучению свойств бактериального белка RecA, играющего ключевую роль в рекомбинационных процессах *E. coli*. Детально анализируется влияние на активность белка аминокислотных замен в его структуре, и участие в этом других регуляторных генов. Значительная часть работы посвящена функционально-структурному анализу белка RecX и исследованию его взаимодействию с белком RecA.

Актуальность исследования хорошо аргументирована: белок RecA является центральным звеном рекомбинационной репарации ДНК и гомологической рекомбинации. В зависимости от типа воздействия он участвует в различных процессах защиты бактериальной клетки. Обеспечивает репарацию одно- и двуцепочечных разрывов ДНК. Кроме «безошибочного» или консервативного пути репарации, белок RecA участвует так же в «ошибочном» пути, где в комплексе с полимеразой PolV инициирует процесс мутагенеза. Результат такой активности важен тем, что приводит к появлению новых генетически устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий. Хотя SOS ответ и работа ошибающихся полимераз у разных видов бактерий имеют индивидуальный характер, процесс индуцированного мутагенеза универсален. Важным фактом является способность белка RecA не только обеспечивать процесс гомологической рекомбинации, но так же индуцировать экспрессию ряда других белков, участвующих в репарации ДНК бактерии.

Диссертация изложена на 205 страницах, состоит из введения, где, сформулированы цель и задачи исследования, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и обсуждения, списка работ автора по теме диссертации и списка литературы, включающего 301 ссылку.

Задачи исследования соответствуют цели и раскрывают ее. Обзор литературы включает основополагающие работы и современные публикации последних лет. Обзор литературы хорошо структурирован и позволяет читателю разобраться в современном состоянии проблемы. В обзоре суммированы мнения ведущих специалистов по проблемам, ставших объектом изучения в диссертации. В частности, в обзоре проводится сопоставление и обсуждение сильных и слабых сторон разных моделей подавления рекомбинации ДНК белком RecX. В конце каждого параграфа автор выделяет проблемные вопросы, данной области, ответам на которые посвящена диссертационная работа. В разделах, где рассматриваются вопросы, наиболее близко относящиеся к задачам диссертационной работы, аргументируется выбор экспериментальных методов, применяемых в экспериментальной части.

Глава Результаты содержит краткое обобщения литературных данных, логически подводящих читателя к сути проблемы. Изложение результатов начинается с данных генетического анализа. В работе автором использована конъюгационная рекомбинация, которая является удобной модельной системой, позволяющий оценить вклад того или иного регуляторного белка в эффективность инициации и терминации гомологической рекомбинации. При этом в ходе конъюгации конститутивный SOS-ответ заблокирован, что позволяет изучать конкретный ген или белок изолированно от остальных медиаторов рекомбинации. В работе представлены результаты изучения нескольких регуляторных генов и множества мутантов по гену *recA*.

Дальнейшие исследования направлены на изучение биохимических свойств мутантных белков RecA, имеющих наиболее выраженные свойства. Раздел, посвященный биохимической активности RecA, представлен обширным экспериментальным материалом и позволяет оценить результаты как в объеме, проведенной работы, так и разнообразию использованных методик. Изучены свойства, определяющие активность филамента на молекуле ДНК: афинность к АТФ, к ДНК, и свойство рекомбиназ вытеснять главный конкурентный белок – белок SSB. Вывод автора сводится к особенностям сборки и разборки филамента, которые лежат в основе активности белков

ResA. При этом, оба процесса не связаны между собой, так как по-разному выражены у исследуемых рекомбиназ. Абсолютно новым по утверждению автора является открытие, что рекомбиногенность может быть следствием изменения синаптной активности филамента, а не только измененной динамики полимеризации на ДНК. В работе убедительно показано, что даже в отсутствие гидролиза АТФ, ряд мутантных белков активнее проводят «реакцию переноса цепи ДНК» *in vitro*. Это наблюдение демонстрирует важный вклад диссертанта в рассматриваемую проблему. Другое важное наблюдение находится в области микробиологии и вскрывает механизмы саморегуляции рекомбиногенного фенотипа бактерий. Исследование «де-эволюционирующей» бактериальной популяции позволяет Д. М. Байтину заключить, что возврат к исходному фенотипу обусловлен падением экспрессии ResA на фоне мутаций в регуляторных участках ДНК.

Отдельный раздел посвящен модели ингибирования рекомбинации регуляторным белком ResX. Приведены данные, касающиеся биохимических особенностей функционирования этого ингибиторного белка. Найдено, что белки ResX и SSB имеют антагонистический характер по отношению к активности филамент. Данное наблюдение является неожиданным поскольку каждый из этих белков по отдельности является сильным ингибитором ResA. Совместно со специалистами в области компьютерного и молекулярного моделирования был смоделирован тройной комплекс, включающий ResA, ResX и ДНК. На основании этой модели и некоторых биохимических данных был выделен ключевой фрагмент белка ResX. Данный пептидный фрагмент с помощью специализированных программ был модифицирован таким образом, что получил способность функционировать, эффективно подавляя белок ResA. По интерпретации результатов использования активного пептида, диссертант склоняется к модели, в которой ключевое значение придается взаимодействию ResX с ДНК.

Изложение результатов хорошо структурировано и логично, что производит хорошее впечатление: данные представлены в хронологическом порядке, сравнение получаемых результатов с литературными данными позволяет оценить вклад автора в развитие проблемы. Полученные в работе результаты отличаются высокой степенью новизны и значимости для дальнейших исследований. Работа выполнена на высоком методическом уровне, включающем методы генетического анализа, биохимические методы, молекулярное и компьютерное моделирование, «одномолекулярный» метод

на установке «лазерный пинцет». Последнее выводит качество исследования на принципиально новую ступень и является редким подходом, если не сказать уникальным на мировом уровне. Полученные в соавторстве автором результаты по конструированию ингибиторного пептида на основе белка RecX потенциально могут иметь прикладное значение и представляются перспективными для расширения практической значимости подобных исследований.

По материалам диссертационной работы имеется ряд вопросов:

- 1) Каким образом антибактериальный пептид может быть трансформирован в бактериальную клетку, чтобы там осуществлялись его функции?
- 2) Известны ли автору попытки выключить RecA белок и какие при этом возникают сопутствующие сложности?

Результаты работы и представленные выводы соответствуют поставленным целям и задачам исследования. По материалам диссертации опубликовано 19 работ, в том числе в ведущих научных высокорейтинговых профильных журналах (например, J.Biol.Chem.; PloS One; J. Bacteriol; Nucleic Acids Research). Представленная диссертация является важным научным исследованием. Полученные диссертантом результаты достоверны, выводы и заключения обоснованы. Автореферат полно отражает основное содержание диссертации.

Диссертация соответствует требованиям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» утвержденным постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 в том числе пп. 9 данного Положения, а ее автор, Дмитрий Михайлович Байтин, заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Заведующий кафедрой
Микробиологии и вирусологии
доктор медицинских наук,
академик РАЕН,
профессор

