



Федеральное государственное унитарное предприятие
"Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов"
Федерального медико-биологического агентства (ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России)
ОКПО 54400262544, ОГРН 1037828027071, ИНН 7813045723, КПП 781301001
Пудожская ул., д. 7, Санкт-Петербург, 197110, тел.: 8 (812) 499-17-00; факс: 8 (812) 230-49-48
e-mail: secretary@hpb-spb.com, www.hpb-spb.com

"УТВЕРЖДАЮ"

И.о. Директора ФГУП «Гос.НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России



Ю.М.Васильев

2018 г

ОТЗЫВ

ведущей организации

на диссертационную работу Дмитрия Михайловича Байтина
«Молекулярные механизмы регуляции активности белка RecA»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук
по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Актуальность темы диссертационного исследования

Белок RecA является центральным ферментом гомологической рекомбинации и рекомбинационной репарации ДНК. Он участвует в нескольких системах защиты бактериальной клетки в зависимости от типа стрессового воздействия. Будучи бактериальной рекомбиназой, он в комплексе с медиаторным белком DprA принимает участие в процессе трансформации экзогенной ДНК в хромосому, что ведет к приобретению новых путей устойчивости к антибиотикам в ходе горизонтального переноса

генов. RecA обеспечивает вариабельность основного патогенного антигена - белка пилина, что позволяет обходить иммунную систему человека, а в комплексе с мутагенной полимеразой запускает процесс мутагенеза, который приводит к появлению новых генетически устойчивых к антибиотикам штаммов бактерий. Также RecA необходим для восстановления синтеза ДНК в местах вынужденной остановки репликативной вилки. RecA не только обеспечивает процесс гомологической рекомбинации, но и индуцирует экспрессию более, чем сорока белков, которые регулируют различные процессы жизнедеятельности микроорганизмов. Поскольку структура и функции RecA сохраняют высочайшую консервативность среди патогенных бактерий, этот белок является перспективной мишенью для конструирования соединений, блокирующих бактериальный SOS-ответ.

Большое семейство RecA-подобных протеинов включает в себя белки Rad51 и Dmc1 эукариот, RecA бактерий и RadA архей. RecA функционирует в виде филамента, связывающегося с одноцепочечной ДНК (оцДНК) в присутствии АТФ и ионов Mg^{2+} . Активированная форма филамента RecA способна взаимодействовать с двуцепочечной ДНК (дцДНК), после чего происходит гомологичное спаривание и обмен нитями между дцДНК и оцДНК.

В настоящее время борьба с патогенными бактериями осуществляется, в основном, с помощью антибиотиков, и очень часто резистентность к этим препаратам микроорганизмы могут приобретать в ходе горизонтального переноса генов устойчивости. При переносе генов или, так называемой, натуральной трансформации включается комплекс RecA-DprA, который осуществляет интеграцию приобретенного гена в хромосому. Комплекс функционирует независимо от SOS-системы бактерии. Кроме того, клетки микроорганизмов могут адаптироваться к внешнему воздействию с помощью активации SOS-ответа, связанного с этим повышенного мутагенеза и перестройки бактериального генома. Этот механизм предполагает появление

мутантов и может рассматриваться как процесс эволюционной адаптации. Одной из потенциальных возможностей преодоления адаптации к антибиотикам является разработка новых способов блокирования SOS-ответа у бактерий с помощью ингибиторов основного белка-инициатора бактериального SOS-ответа - RecA.

В настоящее время известно около десятка вспомогательных белков, участвующих в регуляции активности филамента RecA. Белок RecX - негативный регулятор RecA. Показано, что RecX, взаимодействуя с RecA, препятствует элонгации филамента RecA на ДНК и вызывает диссоциацию этого комплекса. Белок SSB - функциональный антагонист RecX. В присутствии SSB, связывающего одДНК, значительно снижается ингибирующее воздействие RecX на RecA. Поскольку взаимодействие между RecX и SSB не обнаружено, а белок SSB не взаимодействует с RecA, то полагают, что в процесс регуляции вовлечены участки ДНК, которые находятся внутри филамента или сразу за его пределами. Другой регулятор, который традиционно рассматривают в паре с RecX, белок DinI. DinI, в отличие от RecX, связывается с бороздкой филамента RecA, удерживает его от разборки и блокирует доступ гомологичной ДНК для переключения спаривания нитей ДНК. Если работа таких белков, как RecO, RecF и RecR, не угнетает рекомбинационную функцию RecA, то функция белка DinI представляется менее однозначной. Являясь позитивным регулятором филамента RecA, DinI блокирует связывание филамента не только с гомологичной дцДНК, но и с белком RecX. В отличие от других регуляторов RecX обладает наибольшей константой взаимодействия с рекомбинационным комплексом. Для того, чтобы полностью подавить рекомбинацию, достаточно концентрации RecX на два-три порядка ниже концентрации RecA.

В связи с вышеизложенным, цель диссертационной работы Д.М. Байтина - изучение молекулярных механизмов регуляции гомологической

рекомбинации и SOS-ответа рекомбиназным аппаратом клетки и регуляторными белками является, безусловно, актуальной, поскольку касается научно-прикладных проблем, решение которых может иметь важное значение для современной молекулярной биологии и медицины.

Связь с планами соответствующих отраслей науки и народного хозяйства

Диссертационная работа Д.М. Байтина выполнена в соответствии с тематическим планом НИОКР ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (в обеспечение выполнения Государственного задания ФГБУ «ПИАФ» на 2015 - 2017 годы), поддержана грантом РФФИ №14-34-00023 «Исследование механизмов и динамики нуклеотид-связывающих белков: от бактерий до человека» и рядом грантов РФФИ.

Полученные автором новые научные данные, касающиеся особенностей механизма действия прототипов новых лекарственных препаратов пептидной природы - ингибиторов SOS-ответа у бактерий, позволили предложить ряд эффективных научно-обоснованных подходов к их разработке, что подтверждает значение выполненной работы для медицины и народного хозяйства.

Научная новизна

Автором проведено оригинальное комплексное исследование генетических основ гиперрекомбинации на основе систематического анализа основных генов SOS системы клетки, а также мутантов *recA*. Впервые показано, что рекомбиногенность в ходе конъюгационной рекомбинации может изменяться в десятки раз. Детальный анализ выявил наличие естественных механизмов саморегуляции рекомбиногенности в бактериальной клетке.

Впервые продемонстрировано, что степень рекомбиногенности RecA определяется не только динамическими характеристиками процесса мультимеризации филамента на молекуле ДНК, но и увеличением синаптной активности филамента. Проведена оценка вклада регуляторной системы клетки, активаторов и ингибиторов белка RecA в контроль рекомбиногенности. Проведен структурно-функциональный анализ белка RecX, основного ингибитора рекомбинации, усовершенствована модель ингибирования. Благодаря этому удалось выявить активный центр RecX, ответственный за ингибирующую активность.

Впервые разработан системный подход к созданию ингибиторов белка RecA и SOS-ответа бактериальной клетки на основе использования коротких пептидных фрагментов регуляторных белков, участвующих в межбелковых взаимодействиях. В ходе выполнения исследования впервые продемонстрировано, что такие молекулы могут эффективно функционировать на генетическом уровне, останавливая адаптацию бактерий к разрабатываемым антибиотикам.

Достоверность представленных данных, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационное исследование Д.М. Байтина характеризуется высоким методическим уровнем и комплексным подходом к решению поставленных задач, что и обеспечило в конечном итоге успешное достижение целевой установки работы. Используются современные методы молекулярно-генетического и биохимического анализов (гетерологическая экспрессия генов, сайт-направленный мутагенез, анализ трансляционной активности генов, анализ рекомбинационной активности и спонтанного мутагенеза в клетках бактерий, количественный анализ выживаемости, различные виды хроматографии и тестирование энзиматической активности), биофизические

методы (различные виды микроскопии и спектрофотометрии), компьютерное моделирование. Для исследования взаимодействий ДНК-белок и белок-белок использована уникальная установка «лазерный пинцет», реализующая метод оптического захвата, флюоресцентная микроскопия, микрофлюидные устройства.

Объем экспериментального материала, полученный при выполнении представленного исследования, достаточен для получения достоверных результатов, обоснованных выводов и формулировки практических рекомендаций.

Сформулированные выводы и положения аргументированы и логически вытекают из анализа литературных данных и результатов собственных исследований, обработанных с использованием современных методов статистического анализа и высокотехнологичного специализированного программного обеспечения.

По основным результатам диссертационного исследования Д.М. Байтина опубликовано 25 научных работ, из которых 18 публикаций в журналах, входящих в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК, в том числе 18 статей, 1 патент на изобретение. Материалы диссертации в полном объеме представлены на всероссийских и международных научно-практических конференциях и конгрессах.

Основное содержание работы достаточно четко отражено в автореферате, который соответствует основным идеям и выводам диссертации.

Значение полученных результатов для теории и практики

С позиций значимости для науки, интерес представляет принципиально важный вклад в дальнейшее понимание внутриклеточных процессов гомологической рекомбинации и рекомбинационной репарации. Исследованы последствия гиперрекомбинации для метаболизма клеточной

ДНК и негативной селекции гиперрекомбиногенного фенотипа. Охарактеризованы молекулярные механизмы, отвечающие за рекомбиногенность белков RecA.

В перспективе гиперрекомбиногенные белки можно использовать для повышения эффективности процедуры генетической модификации или генотерапии. Создав конструкцию для временной экспрессии гиперрекомбиногенного белка RecA и введя ее в соматические клетки высших эукариот, можно повысить частоту гомологической рекомбинации в клетке, увеличив эффективность адресной доставки генетического материала.

Предложена усовершенствованная модель функционирования одного из самых эффективных негативных регуляторов рекомбинации - белка RecX. Впервые установлено, что небольшой пептидный фрагмент этого белка может быть использован как ингибитор RecA. Поскольку RecA выполняет основную роль в поддержании генетического разнообразия популяций и, в частности, в развитии устойчивости к антибиотикам, одновременное применение пептидных ингибиторов RecA с антибиотиками смогло бы приостановить или даже воспрепятствовать развитию устойчивости бактерий к применяемым лекарствам.

По материалам выполненного диссертационного исследования получен 1 патент на изобретение.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно ставил задачи, решаемые в ходе выполнения диссертационной работы, осуществлял её планирование, разрабатывал методы решения проблем, принимал самое непосредственное участие в получении представленных экспериментальных результатов и координировал деятельность соавторов. На основе полученных данных автором лично был проведен тщательный анализ и статистическая обработка

данных, полученных в ходе исследования, сделаны обоснованные выводы и даны практические рекомендации.

Содержание диссертации и ее завершенность

Диссертационное исследование оформлено по традиционному плану. Общий объем диссертации 205 страниц, список литературы включает 301 источник, результаты работы проиллюстрированы хорошо оформленными рисунками и таблицами.

Общий дизайн диссертационного исследования позволил автору эффективно достичь поставленную цель работы и решить сформулированные для ее достижения задачи. Структура диссертации состоит из введения, главы "Обзор литературы", главы, посвященной характеристике материалов и методов исследования, главы "Результаты и Обсуждение", Заключения, Выводов и списка литературы.

Во введении автор показывает актуальность выполненного исследования, формулирует цели, задачи, основные защищаемые положения, рассматривает научную новизну и практическую значимость полученных результатов.

Обзор литературы отражает современные представления о механизмах регуляции гомологической рекомбинации и SOS-ответа как рекомбинационным аппаратом клетки, так и регуляторными белками, в нем представлены зачастую противоположные точки зрения различных ведущих специалистов. В конце каждого раздела выделены дискуссионные вопросы. В тех разделах, которые наиболее близко относятся к задачам диссертационной работы, обсуждается выбор экспериментальных методов, примененных автором. Обзор литературы написан хорошим литературным языком и может быть рекомендован в качестве обзорной статьи.

В главе "Материалы и Методы" дана подробная характеристика методов, использованных в работе.

Глава "Результаты и Обсуждение" состоит из 12 разделов. Изложение результатов автор начинает с данных генетического анализа. Изучен генетический эффект шести регуляторов и более, чем двух десятков рекомбиназ, несущих аминокислотные замены преимущественно в зоне межмономерного интерфейса.

При исследовании биохимических свойств аналогов RecA с наиболее выраженной рекомбиназной активностью были определены аффинность к АТФ, аффинность к ДНК, устойчивость к солям и способность рекомбиназ филаментировать в присутствии главного ингибиторного белка - SSB, т.е. свойства, определяющие активность и протяженность филамента на молекуле оцДНК. На основе полученных данных автор делает вывод, что процессы сборки и разборки филамента не связаны между собой, и рекомбиногенность может определяться уровнем синаптной активности филамента. Установлено, что даже в отсутствие динамики связывания ДНК и отсутствия гидролиза АТФ, мутантный белок RecAD112R активнее осуществляет поиск и переключение спаренности с гомологичной дцДНК. Исследование мутирующей бактериальной популяции позволило установить механизм саморегуляции рекомбиногенного фенотипа, согласно которому возврат к исходному фенотипу обусловлен падением экспрессии RecA на фоне мутаций в регуляторных участках ДНК.

Отдельный раздел посвящен изучению механизма ингибирования рекомбинации белком RecX. Предложены компьютерные модели комплекса RecA-оцДНК и тройного комплекса RecA-RecX-оцДНК, которые подтвердили ранее сделанные предположения о том, что RecX может самостоятельно связываться с оцДНК с помощью электростатических взаимодействий, и в нуклеопротеиновом комплексе между белком RecX и филаментом, кроме RecA-RecX межбелковых взаимодействий, сохраняются те же самые электростатические взаимодействия между RecX и ДНК.

Кроме того, автору удалось определить пространственное расположение отдельных альфа спиралей белка RecX относительно ДНК и RecA и выделить фрагмент 137-153, имеющий ряд межмолекулярных водородных связей с белком RecA и интеркалирование оснований оцДНК. Аминокислотная последовательность этого альфа-спирального фрагмента была модифицирована с помощью алгоритма SEQOPT с целью конструирования соединения с высокой конформационной стабильностью. Модифицированный пептид был синтезирован, и изучение его активности в большом наборе модельных систем *in vitro* и *in vivo* показало, что он является эффективным ингибитором RecA и SOS-ответа микроорганизмов.

Основные положения диссертационной работы систематизированы в Заключение и 6 выводах, которые базируются на полученном фактическом материале и соответствуют поставленным задачам.

Принципиальных замечаний по работе нет. Имеется несколько замечаний дискуссионного характера и общих вопросов, не влияющих на положительную оценку работы.

Относительно предложенных механизмов действия ряда медиаторов:

- 1) остается ли RecX связанным с ДНК после диссоциации RecA или же комплекс разрушается после ухода RecA?
- 2) каков механизм блокировки белком DinI связывания филамента с гомологичной дцДНК и с белком RecX?
- 3) почему автор считает, что $\Delta\text{ЧРО} = 52$ - максимально возможное увеличение частоты рекомбинационных обменов для микроорганизмов? Ведь это RecAD112R-зависимая рекомбиногенность в *E.coli*. Может ли это значение быть превышено, если взять другой модифицированный белок, например, с заменами в неисследованном фрагменте 140-352, или другую бактерию?

Относительно пептида 4E1:

1) автор утверждает, что "образование дисульфидных связей в бактериальных клетках, как известно, блокируется присутствием глутатиона", и в связи с этим аналоги пептида 4E1 со структурой, стабилизированной дисульфидной связью, бесперспективны. Так ли это?

2) почему аминокислотные замены в аналогах пептида 4E1 должны состоять только из природных остатков? Почему бы не стабилизировать спираль введением α,α -дизамещенных остатков или путем создания ковалентных связей между боковыми цепями аминокислотных остатков?

Замечания по представлению и оформлению материала:

1) обзор литературы содержит разделы, мало относящиеся к главе "Результаты и Обсуждение", часть информации, содержащейся в нем, избыточна;

2) объединение традиционных глав "Результаты" и "Обсуждение" в одну затрудняет восприятие материала и заставляет обращаться к публикациям для определения авторства отдельных результатов;

3) в работе имеются многочисленные орфографические и синтаксические ошибки, затрудняющие восприятие материала, как пример можно привести вывод 3.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Разработанные Д.М. Байтиным выводы вносят существенный вклад в понимание механизмов функционирования системы рекомбинационной репарации, определяют последствия гиперрекомбинации для метаболизма клеточной ДНК и пути негативной селекции гиперрекомбиногенного фенотипа, включают новый подход, направленный на решение практических задач по предотвращению адаптации бактерий к антибиотикам.

Учитывая теоретическую и практическую ценность диссертационной работы Д.М. Байтина, считаем возможным рекомендовать автору

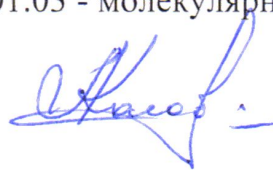
продолжить научные исследования, направленные на изучение процессов гомологической рекомбинации и рекомбинационной репарации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Дмитрия Михайловича Байтина «Молекулярные механизмы регуляции активности белка RecA» является законченным научно-квалификационным исследованием, в котором содержится решение актуальной научной проблемы, заключающейся в определении путей регуляции функций белка RecA под влиянием как аминокислотных замен в структуре белка, так и медиаторных белков рекомбинации, что вносит значительный вклад в понимание внутриклеточных процессов гомологической рекомбинации и рекомбинационной репарации.

По актуальности темы, методическому уровню проведенных исследований, научной новизне и практической значимости диссертационная работа «Молекулярные механизмы регуляции активности белка RecA» соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ №842 от 24 сентября 2013 года, в редакции постановления Правительства РФ № 335 от 21 апреля 2016 года), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Байтин Дмитрий Михайлович заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности - 03.01.03 - молекулярная биология.

Рецензент -

 Колобов Александр
Александрович

Колобов Александр Александрович, д.б.н., к.х.н., заведующий лабораторией химии пептидов ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России. 197706, Сестрорецк, ул. Мосина, д. 10, кв. 90, тел. +7-921-939-96-53.

Отзыв обсужден и утвержден на заседании бюро Ученого Совета Федерального государственного унитарного предприятия «Государственный

научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»
Федерального медико-биологического агентства (ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ»
ФМБА России), протокол № 11 от 06.12.2018 г.

Ученый секретарь, к.х.н.


Мария Павловна Смирнова

Федеральное государственное унитарное предприятие «Государственный
научно исследовательский институт особо чистых биопрепаратов»
Федерального медико-биологического агентства.

Адрес : 197110, г.Санкт-Петербург, ул. Пудожская д. 7

Тел. 8(812)2351225

E-mail: secretary@hpb-spb.com

Подпись Калашова Александра Александровича заверю

Подпись Смирновой Марии Павловны заверю



Руководитель направления
кадрового администрирования

 О.Г. Кришневская
06» 12 2018 г.