

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Прошкина С.А. «Механизмы координации транскрипции с трансляцией и репарацией ДНК у *Escherichia coli*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология (03.01.03).

Одной из фундаментальных особенностей экспрессии генов прокариот является возможность трансляции синтезирующейся мРНК, что сообщает рибосомам прокариот дополнительную функцию регуляции активности РНК-полимеразы. Сопровождение рибосомой активной РНК-полимеразы позволяет бактериям постоянно контролировать уровень экспрессии генов в соответствии с пулами аминокислот и нуклеотидтрифосфатов. Соотношение частот инициации транскрипции и трансляции становится важным фактором экспрессии индивидуального гена. Несмотря на более чем полувековую историю феномена сопряжения трансляции и транскрипции, молекулярные взаимодействия в активном комплексе ДНК/РНК-полимераза/мРНК/рибосома далеко не ясны, их исследование остается **актуальной проблемой**, решению которой посвящена рецензируемая работа С.А.Прошкина.

Целью работы было углубленное изучение роли возвратно-поступательного смещения РНК-полимеразы *in vivo* в преодолении пауз транскрипции, а также выяснение роли смещения РНК-полимеразы на матрице ДНК в функционировании рибосом, белковых факторов репарации Mfd и UvrD.

Были поставлены следующие **конкретные задачи**: измерение скоростей транскрипции и трансляции индивидуального гена в клетках *E.coli* при подавлении трансляции; анализ структурных изменений элонгационного комплекса РНК-полимеразы под влиянием сопровождающей рибосомы в условиях блока транслокации РНК-полимеразы вследствие повреждения участка ДНК или наличия на матрице белка-репрессора; характер действия белков Mfd и UvrD на элонгационный комплекс РНК-полимеразы.

В работе **впервые** сопоставлены скорости транскрипции и трансляции отдельного гена при изменении активности рибосом *in vivo*. Убедительно показана зависимость скорости транскрипции от скорости элонгации соответствующего полипептида. Полученные данные являются уникальными, и должны быть использованы в процессах профессиональной подготовки студентов и аспирантов. Прошкиным С.А. сконструирована **оригинальная модельная система** (плазмиды pEC1 и p^{RBS}1EC), которая позволяет регистрировать изменение положения на ДНК отдельного комплекса РНК-полимеразы в разнообразных условиях ограничения транслокации РНК-полимеразы. Установлено, что рибосома, сопровождающая РНК-полимеразу, препятствует возвратному смещению РНК-полимеразы и способствует транскрипции участков ДНК, расположенных за белком-репрессором. Физиологическое значение этого эффекта не рассматривается, а между тем речь идет о значительном снижении (40%) эффективности репрессии транскрипции. Данные о влиянии сопровождающей рибосомы на структуру и активность РНК-полимеразы носят фундаментальный характер и являются значительным вкладом в современную молекулярную биологию. Значительная часть работы посвящена изучению координации транскрипции и репарации и UvrD. Впервые показано, что не только *in vitro*, но и *in vivo*, фактор Mfd способствует преодолению РНК-полимеразой блока транслокации, при этом наличие повреждений в ДНК не обязательно. Вероятно, фактор Mfd выполняет функцию сопровождающей рибосомы, обеспечивающей продвижение РНК-полимеразы за участок связывания репрессора. Иначе действует белок эксцизионной репарации нуклеотидов UvrD: при блокировании репрессором транслокации РНК-полимеразы фактор UvrD провоцирует смещение комплекса против хода транскрипции. Автор предполагает, что и при остановке РНК-полимеразы на

поврежденных участках ДНК происходит ее обратное смещение, что обеспечивает доступность поврежденного участка для репарационных белков. Однако, не ясно, каков был бы эффект одновременного противоположного влияния рибосом и UvrD. Отдельную группу представляют данные о действии генотоксичных реагентов, провоцирующих эксцизионную репарацию ДНК, на мутанты с инактивированными генами *uvrD*, а также *greA/greB*, которые, как известно, препятствуют возвратному смещению РНК-полимеразы. Показано, что инактивация генов *greA/greB* супрессирует чувствительность мутанта *uvrD* ко многим генотоксическим реагентам и к УФ. Также показана супрессия NusA-зависимой чувствительности к УФ и митомицину при инактивации гена *greB*. Данные о действии генотоксичных реагентов не противоречат основным результатам рассмотренным выше, однако не представляются необходимым их дополнением.

Полученные экспериментальные данные позволили соискателю сформулировать и обосновать новые представления о молекулярных механизмах координации транскрипции с трансляцией и репарацией, подробно изложенные в автореферате и опубликованные в ведущих международных изданиях. Следует подчеркнуть высокий методический уровень рецензируемой работы. В лице С.А.Прошкина отечественная наука располагает высококлассным специалистом, научным работником с большим творческим потенциалом, безусловно заслуживающим присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология.



Доктор биол. наук
Профессор

[Handwritten signature]

Р.С.Шакулов

12.04.2014

Исх. № *Р.С. Шакулов*
 Подпись: *Александр Прошкин*
 21 апреля 2014 г.