

## ОТЗЫВ

на диссертацию С.А. ПРОШКИНА

### **«Механизмы координации транскрипции с трансляцией и репарацией ДНК у *Escherichia coli*»,**

представленную на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук  
по специальности «молекулярная биология»

Представленное к защите диссертационное исследование С.А. Прошкина служит примером исключительной во многих отношениях работы. Во-первых, оно посвящено взаимосвязи основных, базовых процессов, обеспечивающих жизнедеятельность бактериальной клетки – транскрипции, трансляции и репарации ДНК. Очевидно, что тематика работы не просто фундаментальна – она относится к классике молекулярной биологии, которую намного привычнее встретить в учебниках по этой дисциплине, чем в кандидатской диссертации. Эта направленность работы на основы жизнедеятельности клетки сообщает диссертационному исследованию беспрецедентную актуальность, не нуждающуюся в комментариях по причине их очевидности. Во-вторых, полученные С.А. Прошкиным результаты полностью соответствуют масштабу избранной тематики. Они убедительны и красивы, а их научное значение исключительно высоко. У меня нет сомнений в том, что эти результаты очень скоро войдут в учебники и станут неотъемлемой и обязательной частью системы знаний, именуемой молекулярная биология. Не могу не отметить и ещё одну черту, выводящую работу Прошкина из многочисленного ряда современных диссертаций: она великолепно написана. Свободный, ясный и точный язык работы выявляет не только настоящую научную зрелость, но и высокий профессионализм её автора. Такое совпадение научных достижений и качества их текстового представления – явление редкое и отрадное.

До перехода к подробному разбору диссертационной работы хочется упомянуть, что С.А. Прошкиным получены три крупных, значительных научных результата, каждый из которых сам по себе достоин присуждения учёной степени кандидата биологических наук. Особенно красиво и убедительно доказательство того, что движущаяся по транскрипту лидирующая транслирующая рибосома «подталкивает» РНК-полимеразу, производящую этот транскрипт. При этом

замедление или ускорение рибосомы немедленно замедляет или ускоряет транскрибирующую полимеразу, в результате чего скорости трансляции и транскрипции (измеренные в нуклеотидах в секунду) остаются одинаковыми. Не могу не восхититься элегантностью применённого в диссертации подхода для точного измерения скоростей обоих процессов внутри клетки, а также приёма, позволившего с помощью рибосомных антибиотиков и замедлять, и ускорять трансляцию. Также красиво и остроумно были созданы конструкции, позволяющие получать в клетках одиночные элонгационные комплексы РНК-полимеразы, на растущие полирибонуклеотиды которых можно по произволу «усаживать» транслирующую рибосому.

Вместе с тем даже у красивых методов имеются ограничения. И, поскольку в обсуждении результатов диссертации Прошкина ограничения некоторых методов не упоминаются, позволю себе коснуться их в отзыве. Так, скорость элонгации трансляции измеряли по появлению энзиматически активного фермента,  $\beta$ -галактозидазы. Таким образом, скорость движения по мРНК рибосом, синтезирующих неактивный фермент (неправильно сворачивающийся, например) осталась неизвестной. Можно предположить, хотя это и крайне маловероятно, что скорость трансляции у таких рибосом могла оказаться меньше скорости продукции мРНК (т.е. скорости движения полимеразы по матрице ДНК). Если это так, то сопряжение транскрипции с трансляцией не распространяется на рибосомы, синтезирующие aberrantly сворачивающийся растущий полипептид и выводы диссертации, строго говоря, относятся только к рибосомам, продуцирующим энзиматически активный белок. Ещё раз отмечу, что такая ситуация крайне маловероятна, но упомянуть её в обсуждении результатов или в описании методов следовало бы.

Далее, для подсчёта скорости элонгации трансляции длину синтезируемой полипептидной цепи, 1023 аминокислотных остатка, делили на время, необходимое для появления ферментативной активности синтезируемого белка. Но этот промежуток времени затрачен не только на элонгацию растущего полипептида, но и на инициацию и терминацию трансляции. Разумеется, вклад этих стадий трансляции во время, затрачиваемое на построение одной молекулы белка, невелик: всего два шага (начало синтеза и его конец) на фоне 1023 шагов элонгации вряд ли могут исказить полученные значения скорости элонгации. Важнее другое: действительно ли необходимо 1023 элонгационных цикла, чтобы синтезируемая полипептидная цепь проявила ферментативную активность, или эта активность может появиться у более короткого растущего полипептида? Такую возможность следовало бы, по меньшей мере, обсудить, тем более, что в литературе имеются намёки на сворачивание растущей цепи  $\beta$ -галактозидазы в энзиматически активную структуру до завершения её синтеза, т.е. ещё на рибосоме [Cowie D.B., Spiegelman S., Roberts R.B., Duerksen J.D. (1961) Ribosome-bound  $\beta$ -galactosidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **47**, 114 – 122; Zipser

D., Perrin D. (1963) Complementation on ribosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **28**, 533 – 537; Kiho Y., Rich A. (1964) Induced enzyme formed on bacterial polyribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **51**, 111 – 118; Hamlin J., Zabin I. (1972)  $\beta$ -galactosidase: immunological activity of ribosome-bound, growing polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 412 – 416.]. Если допустить, что активностью обладает более короткая цепь  $\beta$ -галактозидазы, то окажется, что измеренное значение скорости элонгации полипептида завышено, и, значит, транскрибирующая рибосома «отстаёт» от полимеразы и не может её «подталкивать». Рассмотрение такой ситуации не повредило бы обсуждению результатов, хотя она вряд ли реализуется в действительности.

Переходя к тексту диссертационной работы С.А. Прошкина можно сказать, что она построена по общепринятому плану и содержит все необходимые структурные элементы. Первый раздел диссертации, введение, полностью отвечает названию диссертации, в нём ясно сформулирована постановка проблемы и намечен план её решения, а также приведены необходимые сведения для вхождения в круг рассматриваемых вопросов. Введение содержит также краткое описание полученных результатов.

Обзор литературы включает в себя шесть глав, посвящённых описанию структуры и функции элонгационного комплекса РНК-полимеразы и регуляции элонгации транскрипции. К большим достоинствам обзора я отношу полный охват литературы по этим вопросам с особым вниманием к недавним публикациям, а, главное, чёткую структуру и логику изложения. Обзор получился лаконичным и очень функциональным (не содержащим избыточной информации, лишней для дальнейшего изложения, но превосходно вводящим читателя в проблему). Особенно приятное впечатление оставляет композиционная сбалансированность обзора и выраженность авторских акцентов в изложении, явившаяся результатом отличной аналитической работы, проделанной автором диссертации. Всё это свидетельствует о профессионализме и глубокой эрудированности автора.

Раздел диссертации, описывающий использованные материалы и применённые методы, написан очень тщательно, с упоминанием всех деталей экспериментов, подробным описанием штаммов, приведением последовательностей использованных олигонуклеотидов и схем плазмид. Очевидно, что автор диссертации отлично владеет внушительным арсеналом молекулярнобиологических методик. Следует отметить, что в работе С.А. Прошкина экспериментальные подходы всегда соответствуют поставленной задаче и приводят к её эффективному решению. Удивительно, но в описании методик отсутствуют лабораторный жаргон и англицизмы; автор диссертации действительно строг в употреблении терминов, и это абсолютно не усложняет восприятие материала. Единственный пробел, который мне удалось отыскать в разделе «Материалы и методы» – это отсутствие описания того, как получали численные значения выживаемости клеток с инактивированными *greA/B* и *uvrD* (опыты

для рисунка 26, стр. 77). Кроме этого, рисунки 6, 7 и 8, иллюстрирующие подраздел «Выделение РНК-полимеразы *E. coli*», следовало бы перенести из раздела методов в раздел результатов, поскольку они именно результат и описывают. В остальном описание методик превосходно.

Изложение результатов исследования С.А. Прошкина написано с чёткой и логичной структурой, читается с большим интересом и воспринимается очень легко. О качестве и научной ценности результатов этой диссертации я уже говорил – она выше всяких похвал. В то же время один из результатов диссертации остался для меня необъяснимым и не обсуждённым. Речь идёт о результате, представленном рисунком 26 А, панель «УФ» (стр. 77). Автор диссертации доказывает важность белка *uvrD* для выживаемости клеток, вынужденных интенсивно репарировать ДНК, повреждённую ультрафиолетом. При этом из рисунка видно, что клетки на дорожках С и D, представляющих выживаемость бактерий с инактивированным *uvrD*, выживают лучше, чем клетки дикого типа (дорожка А), в которых активный *uvrD* присутствует. Этот результат противоречит выводу автора и остаётся без комментариев. В то же время другие панели рисунка 26, описывающие выживаемость в условиях вызванного генотоксичными реагентами шока, подтверждают авторские выводы о роли *uvrD*. Это противоречие хотелось бы как-то разрешить. Также следовало бы поправить описание рисунка 17 на стр.64 и в автореферате, где имеется «эффект *предшествующего* элонгационного комплекса на *впереди идущий* комплекс». *Предшествующий* и *впереди идущий* – синонимы. Говоря о качестве полученного в диссертации С.А. Прошкина экспериментального материала следует добавить, что все результаты в ней подтверждены необходимыми контрольными опытами, поставленными грамотно и профессионально. Поэтому легко согласиться с автором в его трактовке результатов и в следующих из неё выводах.

Отдельно хочу отметить высокое качество иллюстративного материала диссертации С.А. Прошкина: рисунки, призванные иллюстрировать результаты исследования и составляющие главную часть любой экспериментальной работы, выполнены очень тщательно, а их лаконичность и логика вместе с краткими, но информативными подписями, делает восприятие результатов лёгким и приятным.

Глава «Обсуждение результатов» в диссертации Прошкина очень интересна и воспринимается легко. Очевидно, что её автор является не только очень эрудированным биологом, но и профессионально мыслящим исследователем, способным делать интересные выводы и глубокие обобщения. Я полностью согласен с представленной в «Обсуждении результатов» авторской трактовкой. Таким образом, можно заключить, что диссертационную работу Прошкина увенчал ряд ярких, оригинальных результатов, которые были грамотно обсуждены и привели к корректным и строгим выводам, к тому же хорошо сформулированным.

