

ОТЗЫВ

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

Элонгация растущих цепей РНК во время их синтеза ДНК-зависимыми РНК-полимеразами (элонгация транскрипции) наряду с другими основными этапами транскрипции – инициацией и терминацией – является объектом многочисленных регуляторных воздействий, играющих ключевую роль в регуляции экспрессии генов. Многолетние исследования транскрипции у живых организмов демонстрируют ее тесную связь с другими глобальными процессами реализации генетической информации: трансляцией, репликацией ДНК, репарацией ее повреждений и рекомбинацией. В живом организме функционирует единый координированный процесс реализации генетической информации, функциональные отношения между отдельными частями которого в настоящее время еще недостаточно изучены. В этой связи не вызывает сомнений актуальность диссертационной работы С.А. Прошкина, в которой представлены доказательства функционирования новых молекулярных механизмов сопряжения транскрипции с трансляцией и репарацией в бактериальных клетках.

Рецензируемая работа представляет собой хорошо продуманное законченное исследование, подчиненное строгой логике. Начав с самого главного, экспериментально продемонстрировав в начале работы четкую глобальную взаимосвязь между скоростями транскрипции и трансляции *in vivo* в разных физиологических условиях, автор далее детально исследует данное явление, открывая новые механизмы сопряжения транскрипции, трансляции и репарации. Полученные результаты в конечном счете позволяют ему разработать оригинальную непротиворечивую модель координированного функционирования этих систем.

Диссертация, включающая в себя обширный экспериментальный материал, лаконично изложена на 104 страницах компьютерного текста и построена по обычному плану; то есть состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, их обсуждения и выводов. Список литературы включает 211 источников, в основном, на английском языке. Вся диссертация написана хорошим литературным языком, тщательно оформлена, отлично иллюстрирована и не содержит опечаток.

Во введении автор подчеркивает актуальность проблемы, четко формулирует цели и задачи исследования.

Обзор литературы дает читателю исчерпывающую современную информацию о структуре и функционировании элонгирующего транскрипционного комплекса у бактерий, включая описание функциональных участков у бактериальной ДНК-зависимой РНК-полимеразы и каталитических активностей, ассоциированных с ферментом. Основная часть обзора, как и следовало ожидать, посвящена рассмотрению этапов и механизмов элонгации транскрипции и ее регуляции. Особое внимание С.А. Прошкин уделяет неравномерности элонгации строящихся цепей РНК, а также механизмам терминации и антитерминации транскрипции. В целом обзор литературы представляет собой хорошее введение к экспериментальной части работы и является ее органичной частью. Тем не менее, отсутствие заключения, которое бы обобщало рассмотренные в обзоре данные литературы и формулировало нерешенные проблемы, ставшие объектом экспериментального исследования диссертационной работы, несколько портит общее впечатление от этого ее раздела.

Обширная глава «Материалы и методы» включает подробное описание подходов и конкретных методик, которые автор применил для решения поставленных задач. Здесь С.А. Прошкин демонстрирует универсальную подготовку к проведению экспериментов, владение современными молекулярно-биологическими, генетическими и биохимическими методами. При выполнении диссертации ему приходится разрабатывать эффективные олигонуклеотидные праймеры и зонды, конструировать сложные плазмидные векторы, многочисленными бактериальными штаммами с разными генотипами, измененными направленным мутагенезом, получать препараты высокоочищенной РНК-полимеразы, применять радиоактивные изотопы. Стил изложения материала, на мой взгляд, дает возможность воспроизвести результаты диссертации.

В начале экспериментальной части работы С.А. Прошкин прежде всего убеждается, что тесное сопряжение транскрипции и трансляции в бактериальных клетках действительно существует. Благодаря разработанному автором высокоточному методу определения скоростей синтеза РНК и белка *in vivo* удастся четко продемонстрировать взаимозависимость этих двух процессов в разных физиологических условиях существования клеток *E. coli*. Далее с помощью изящной молекулярно-генетической системы, в которой лишь один элонгирующий комплекс РНК-полимеразы задерживается Lac-репрессором перед последовательностью оператора, убедительно продемонстрировано прямое участие транслирующих рибосом в предотвращении обратного перемещения остановленного транскрипционного комплекса вдоль ДНК и

преодолении РНК-полимеразой белкового препятствия. Работающие рибосомы, по-видимому, путем прямого контакта с РНК-полимеразой, подталкивают фермент в нужном направлении. Сделанные наблюдения позволили С.А. Прошкину предположить, что стимулирующее действие активных рибосом на транскрипцию реализуется через блокировку отката РНК-полимеразы (и тем самым ее временной инактивации) в местах возникновения пауз при синтезе РНК на транскрибируемой ДНК. Особую ценность эти и далее полученные данные приобретают от того, что все они получены в опытах на живых бактериальных клетках.

Вторая половина работы посвящена исследованию сопряжения процессов транскрипции и репарации *in vivo*. Представленные результаты подтверждают и углубляют основные выводы, сделанные в первой части диссертации. Прежде всего автору путем прямых экспериментов удастся продемонстрировать, что белковый бактериальный фактор Mfd, входящий в систему репарации, действительно способствует освобождению РНК-полимеразы от ДНК-матрицы из остановленного перед препятствием (в виде Lac-репрессора) комплекса. Методом футпринтинга *in vivo* автором было показано, что в полученных мутантных клетках, не содержащих Mfd, РНК-полимераза задерживается перед препятствием значительно дольше, чем в изогенных клетках дикого типа. Далее С.А. Прошкин четко демонстрирует, что другой белковый фактор системы репарации, UvrD, в условиях сверхэкспрессии обеспечивает обратное смещение остановленного РНК-полимеразного комплекса, что открывает занятый перед этим РНК-полимеразой участок ДНК действию белков системы репарации. В заключительной части диссертационной работы автор подтверждает правильность сделанных ранее выводов и предположений, исследуя влияние различных мутантных по изучаемым белковым факторам генотипов на чувствительность бактериальных клеток к разным мутагенным воздействиям. К недостаткам всей диссертационной работы следует отнести чрезмерную лаконичность сделанных выводов 2 и 5, в которых, на мой взгляд, должна быть отражена суть предложенных автором теоретических моделей, а не простая констатация того, что такие модели были созданы.

Подводя итог всему сказанному, можно заключить, что в процессе выполнения диссертационной работы А.С. Прошкин показал себя широко образованным эрудированным исследователем, свободно владеющим современными методами биохимии, молекулярной биологии и генетики. Автору удалось получить много новых экспериментальных данных, объясняющих взаимосвязь трех глобальных процессов реализации генетической информации в бактериальных клетках – транскрипции, трансляции и репарации повреждений ДНК. Построена оригинальная, хорошо

обоснованная модель макромолекулярных взаимодействий при совместном функционировании трех этих механизмов. Все основные результаты диссертации опубликованы в высокорейтинговых рецензируемых журналах. Выводы работы хорошо обоснованы и не вызывают сомнений. Автореферат диссертации достаточно полно отражает ее содержание. С учетом всего вышесказанного считаю, что диссертация полностью отвечает требованиям, установленным Положением о порядке присуждения ученых степеней, утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 30 января 2002 г. № 74 (в редакции постановления Правительства Российской Федерации от 20 июня 2011 г. №475) к кандидатским диссертациям, а ее автор, С.А. Прошкин, несомненно заслуживает присуждения ему искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 –молекулярная биология.

28 апреля 2014 г.

Ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук,
доктор биологических наук, профессор

Л.И. Патрушев

Собственноручную подпись Л.И. Патрушева удостоверяю:

Ученый секретарь ИБХ РАН, доктор физико-математических наук



В.А. ОЛЕЙНИКОВ