



ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук, – на диссертацию Прошкина Сергея Александровича “Механизмы координации транскрипции с трансляцией и репарацией ДНК у *Escherichia coli*”, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Диссертационная работа Прошкина С.А. посвящена изучению ключевых процессов, лежащих в основе передачи и экспрессии генетической информации: транскрипции, трансляции и репарации, и выполнена на классическом модельном объекте – кишечной палочке *Escherichia coli*. Несмотря на то, что исследования именно этой модели, ведущиеся на протяжении уже более полувека, явились основой многих фундаментальных концепций современной молекулярной биологии, автору в своей работе удалось сделать несколько выдающихся открытий, которые, несомненно, войдут в учебники по молекулярной биологии. Эти открытия позволяют по-новому взглянуть на сопряжение различных генетических процессов в клетках бактерий и, как можно ожидать, окажут серьезнейшее влияние на дальнейшие исследования в нескольких областях молекулярной генетики и биологии. Данная работа уже получила международное признание, о чем свидетельствуют публикации ее основных результатов в статьях в журналах *Nature* и *Science* (причем во втором случае с первым авторством соискателя) и опубликованные в этих же журналах комментарии к статьям. Высокая актуальность работы определяется и тем, что изучаемые процессы являются универсальными для всех живых организмов, и многие закономерности, обнаруженные в данном исследовании, могут оказаться общими как для прокариот, так и для эукариот.

Диссертация Прошкина С.А. включает в себя Обзор литературы, разделы Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Выводы, Список сокращений и Список литературы, содержащий 211 ссылок. В тексте работы имеется 30 рисунков и 3 таблицы.

Обзор литературы посвящен рассмотрению основных особенностей структуры и функций бактериальной РНК-полимеразы, а также механизмов регуляции ее активности разными группами факторов на стадии элонгации транскрипции. В первом разделе обзора кратко описаны основные структурные черты РНК-полимеразы и элонгационного комплекса, а также приведены современные данные о механизмах включения нуклеотидов в растущую цепь РНК и транслокации фермента по матрице ДНК. Далее подробно рассмотрены различные механизмы терминации транскрипции и ее регуляции. В заключительной части обзора в сжатой форме приведены сведения о регуляции синтеза РНК разными классами факторов элонгации транскрипции, в том числе, Gre-подобными факторами, белками NusA, NusG и RfaH, а также факторами терминации Mfd и Rho. Стоит отметить, что, несмотря на огромный объем фактического материала и необходимую краткость изложения, определяемую формой диссертации, автору удалось охватить основные принципы транскрипционной регуляции и представить их ясное и четкое изложение. Обзор демонстрирует прекрасную осведомленность автора о современном состоянии исследований в данной области науки и его несомненный талант к анализу и представлению научных данных.

Раздел Материалы и методы содержит детальную и исчерпывающую информацию об использованных в работе реактивах, материалах и методических подходах. В данном разделе дотошно перечислены практически все необходимые реактивы, ферменты, материалы и оборудование, причем с указанием производителей, что может служить образцовым примером для оформления методических разделов многих работ. Диссертация также производит прекрасное впечатление по широте примененных методических подходов, которые включают как стандартные методы молекулярной биологии, так и новые методики, в том числе, разработанные в данной работе, а также эксперименты с культурами клеток бактерий *in vivo*.

Раздел Результаты состоит из двух основных частей, посвященных координации транскрипции с трансляцией и с репарацией. В первой части проведены измерения относительных скоростей транскрипции и трансляции в клетках бактерий в различных условиях, а также изучено влияние различных факторов на скорость и паузы транскрипции в зависимости от наличия транслирующей рибосомы. Показано, что рибосома предотвращает обратное смещение транскрипционных комплексов и способствует прохождению ими белковых препятствий на матрице ДНК; в результате именно процесс трансляции во многом определяет скорость транскрипции той или иной матрицы.

Вторая часть работы посвящена изучению сопряжения процессов транскрипции и эксцизионной репарации нуклеотидов. Хорошо изученным фактором, вовлеченным в сопряжение транскрипции и репарации, является белок Mfd, который является АТФазой и способен осуществлять прямую транслокацию остановленных транскрипционных комплексов, приводя к их диссоциации и привлекая другие факторы репарации к экспонированному поврежденному участку ДНК. Однако, в данной работе показано, что ключевую в сопряжении транскрипции и репарации, возможно, играет другой белок – хеликаза UvrD, которая, наоборот, вызывает обратную транслокацию транскрипционных комплексов без их диссоциации, что также высвобождает поврежденный участок ДНК и делает возможной его репарацию. При этом после исправления повреждения транскрипционный комплекс может продолжить свою работу.

В работе проведены многочисленные эксперименты для проверки предложенного механизма, в том числе, проанализированы факторы, способствующие прямой или обратной транслокации РНК-полимеразы. Полученные результаты хорошо согласуются именно со второй моделью сопряжения транскрипции и репарации. Замечательным достоинством работы является то, что основные наблюдения, полученные в экспериментах *in vitro*, получили подтверждение и в системе *in vivo*, в клетках бактерий. С этой целью в работе был получен и исследован целый ряд штаммов, содержащий мутации в исследуемых транскрипционных факторах.

Раздел Обсуждение в краткой форме подводит итоги всей работы. В нем представлены модели сопряжения транскрипции с процессами трансляции и репарации, полученные по результатам проведенных исследований, которые позволяют объяснить многие опубликованные ранее данные о влиянии разных регуляторных факторов на данные процессы. Все результаты описаны четко и подробно, их изложение подчинено строгой логике, и чтение всей диссертации вызывает настоящее научное удовольствие. Среди наиболее интересных и важных результатов работы следует отметить следующие:

- 1) Показано, что ко-транскрипционная трансляция синтезируемой РНК увеличивает скорость и эффективность транскрипции в клетках бактерий. Данное открытие позволяет принципиально по-новому взглянуть на процессы сопряжения транскрипции и трансляции, которое ранее считалось во многом пассивным процессом (в частности, можно было ожидать, что, наоборот, скорость транскрипции должна влиять на скорость трансляции).
- 2) Открыт новый механизм репарации ДНК, сопряженной с транскрипцией: обнаружено, что хорошо известная хеликаза UvrD напрямую взаимодействует с

РНК-полимеразой и осуществляет обратную транслокацию транскрипционных комплексов, остановленных в поврежденных участках ДНК, что обеспечивает их дальнейшее восстановление.

Стоит отметить, что одной из важных составляющих успеха данной работы явилось плодотворное сотрудничество соискателя и его научного руководителя с лабораторией Е. Нудлера в New York University School of Medicine (Нью-Йорк, США). При этом необходимо подчеркнуть, что значительная часть исследований выполняется именно в нашей стране, что подчеркивает самостоятельность и большую научную значимость работы соискателя.

Представленная диссертационная работа практически лишена недостатков. Единственным слабым местом является формулировка некоторых из выводов. В частности, вывод 2 звучит как «Предложена модель контроля транскрипции транслирующими рибосомами», а вывод 5 – «На основании экспериментальных данных построена модель координации транскрипции с репарацией ДНК». Данные формулировки не являются содержательными, стоило бы очень кратко описать суть предложенных моделей.

Как уже было сказано выше, основные результаты диссертационной работы Прошкина С.А. опубликованы в двух самых престижных международных научных журналах, а также представлены на конференциях. Проведенный автором анализ результатов и сделанные выводы полностью соответствуют полученным в работе результатам. В автореферате адекватно отражено основное содержание и выводы работы.

Результаты диссертации и полученные в ней новые модели сопряжения генетических процессов могут быть (и, несомненно, будут) использованы для проведения фундаментальных исследований в области регуляции экспрессии генов в целом ряде научных учреждений нашей страны, включая Федеральные государственные бюджетные учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Институт молекулярной генетики РАН, Институт биологии гена РАН, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Институт цитологии и генетики СО РАН, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Федеральное государственное унитарное предприятия «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов», Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова и других научных учреждениях. Результаты работы С.А. Прошкина могут также иметь прикладное биотехнологическое значение и использоваться для конструирования бактериальных штаммов для продукции белков и исследования ингибиторов транскрипции и репарации и

разработки новых антибиотиков. Основные выводы исследований должны также найти свое место в курсах лекций по молекулярной биологии и генетике в ведущих ВУЗах нашей страны. Стоит отметить, что результаты данной работы уже используются для обучения студентов в нескольких учебных заведениях, включая Биологический факультет МГУ им. М.В.Ломоносова.

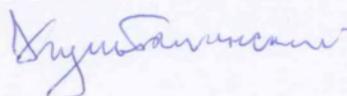
В целом, диссертационная работа С.А. Прошкина полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в «Положении о порядке присуждения ученых степеней» ВАК РФ, и является научно-квалификационной работой, в которой проведены многоплановые исследования механизмов координации транскрипции с процессами трансляции и репарации в бактериальных клетках, и вносит существенный вклад в понимание фундаментальных принципов генетической регуляции. Прошкин С.А., безусловно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре Лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ИМГ РАН от 6 мая 2014 г. (протокол № 4).

Зав. Лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов

Отдела молекулярной генетики клетки ИМГ РАН

доктор биол. наук

 /А.В. Кульбачинский/