

**ОТЗЫВ официального оппонента**  
**на диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук**  
**Плетнева Филиппа Игоревича на тему: «Новые особенности регуляции аппарата экспрессии**  
**генов в стационарной фазе бактериальной культуры *E. coli*» по специальности 02.00.10 –**  
**биоорганическая химия (химические науки).**

**Актуальность и практическая значимость выбранной темы.** Бактериальные инфекции часто представляют значительную угрозу жизни человека, поэтому исследование молекулярной биологии патогенных, а также непатогенных бактерий до сих пор имеет высокую практическую значимость. В основном работы по изучению бактерий фокусируются на активно делящихся бактериях, т.е находящихся в так называемой логарифмической фазе роста культуры. В то же время, при достижении высокой плотности культуры и истощения питательных веществ культуры бактерии переходят в стационарную фазу, в которой имеет место равновесие между процессами деления и гибели клеток. Очевидно, что в таком состоянии культуры бактерии находятся в ином метаболическом состоянии, чем в стадии непрерывного деления. В частности, они имеют измененную чувствительность к различным антибиотикам и различным стрессовым воздействиям. Диссертационная работа Ф.К. Плетнева направлена на изучение ряда процессов в бактериях *Escherichia coli* в стационарной стадии роста культуры, что несомненно крайне актуально.

Работа Филиппа Игоревича Плетнева посвящена изучению причин измененного фенотипа штамма  $\Delta rimK$  *E.coli*, у которого имеется делеция гена АТФ-зависимой L-глутаматлигазы (RimK). Причина необходимости исследований обосновывается тем, что эти изменения по сравнению со штаммом дикого типа не исчезают при реэкспрессии гена указанного фермента. Методом полногеномного секвенирования выявлено наличие мутации, кодирующую замену аминокислотного остатка в гене  $\sigma^{70}$  фактора, что и дало объект исследования. Автор выявил, что данная мутация влияет как на сродство ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактерий к промоторам и чувствительности фермента к факторам строгого ответа, а также к изменению кинетики роста культуры при выходе из стационарной фазы (лаг-фаза) и чувствительности клеток к антибиотикам в этой фазе. Кроме того, исследование Плетнева Ф.И. вносит понимание регуляции процесса редкой посттрансляционной модификации рибосомного белка S6 *E.coli* - олигоглутамилирования, происходящего в стационарной фазе. Таким образом, диссертационная работа вносит значительный вклад в понимание изменений метаболизма клеток при переходе от логарифмической к стационарной фазе роста и описывает роль и механизмы влияния мутации I48S  $\sigma^{70}$  фактора на различные происходящие в клетке процессы. Эти данные расширяют понимание процессов, происходящих в стационарной фазе роста культуры бактерий. Несомненно, они представляют собой

значительный интерес как для фундаментальных, так и прикладных исследований. Научная новизна полученных данных сомнений не вызывает.

Диссертационная работы выполнена на очень высоком уровне с помощью широкого арсенала современных методов молекулярной биологии, биохимии и геномных технологий. Плетнев Ф.И. конструировал новые штаммы *E.coli*, участвовал в анализе данных полногеномного секвенирования, проводил генноинженерные работы, изучал кинетику накопления и деградации белков с использованием как радиоактивно-меченных метаболитов, так и современных генетически-кодируемых флуоресцентных сенсоров и анализом сигнала проточной цитометрией, а также исследовал посттрансляционную модификацию белка S6 масс-спектрометрией. Кроме того, он участвовал в измерении активности РНК-полимеразы бактерий, выделял рибосомы, измерял уровни экспрессии генов методами ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией и вестерн-блоттингом. Все эти методы позволили сделать и обосновать представленные в диссертационной работе выводы.

**Структура диссертации.** Диссертация построена по классическому плану и содержит следующие разделы: Введение, в котором сформулированы задачи исследования, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Выводы и список литературы. Работа изложена на 151 страницах, включает 38 рисунков и 3 таблицы, список цитируемой литературы состоит из 159 наименований. Материал диссертации изложен очень подробно, связно и весьма логично, все ключевые результаты подтверждены результатами экспериментов, приведенных на рисунках и таблицах.

Раздел "Обзор литературы" посвящен анализу имеющихся данных об экспрессии генов при переходе культуры от логарифмической стадии роста к стационарной и механизмах регуляции их экспрессии. Подробно рассмотрены белковые факторы, взаимодействующие с ДНК и описано их влияние на структуру нуклеиновой кислоты, структура и регуляция РНК-полимеразы и ее факторов в стационарной фазе, явление т.н. "строгого ответа", а также механизмы защиты бактериальной клетки в условиях умеренного и сильного голода. Таким образом, этот обзор дает введение для понимания состояния исследований в области и далее вклада диссертанта в ее развитие, а также обоснованности формулировки задачи. Следует особо подчеркнуть, что данный обзор был подготовлен на основании обзорной статьи Плетнева Ф.И., напечатанной в журнале *Acta Naturae*.

В главе «Материалы и методы» подробно описаны все использованные методики. Следует особо отметить тщательность и аккуратность диссертанта в изложении методик, составов всех растворов, описании штаммов клеток. Несомненно, такая скрупулезность делает все представленные методы воспроизводимыми.

В разделе "Результаты" описана постановка задачи работы и последовательно изложены все проведенные эксперименты. Так, описано выявление мутации  $\sigma^{70}$  фактора в ранее исследованном

штамме клеток E.coli, показано ее влияние на кинетику роста клеток, их выживаемость в стационарной фазе и метаболическую активность и показано, что мутантный штамм характеризуется большей скоростью трансляции в стационарной и лаг-фазах. Следует отметить элегантность одного из использованных методов, основанного на использовании генетически-кодируемого флуоресцентного сенсора, имеющего разный спектр испускания на ранней и поздней стадиях своей жизни. Подобные сенсоры начинают активно использоваться для определения времен жизни белков и органелл, а также их динамики и взаимодействия между собой. Далее был исследован транскриптом штамма I48S и выявлены пути, экспрессия генов которых отличается между этим и диким штаммами на разных стадиях роста культуры. Следующим этапом стало изучение влияния мутации  $\sigma^{70}$  фактора на активность ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактерий и выявлено, что данная мутация меняет стабильность промоторных комплексов. Наконец, на заключительном этапе было исследовано полиглутамилирование 6S РНК на разных стадиях роста бактериальной культуры и показано, что данный процесс имеет место в стационарной фазе, что связано с замедлением общей скорости трансляции в клетке.

В следующем разделе "Обсуждение результатов" диссертант помещает выводы работы в контекст исследований в данной области молекулярной биологии.

Диссертационная работа Плетнева Ф.И. выполнена на очень высоком научном и техническом уровне, логична и детально описана. Достоверность всех результатов гарантируется несколькими методами исследования и полностью подтверждена представленными экспериментальными данными. Выводы работы полностью соответствуют результатам, автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации.

По сути работы замечаний нет. Это редкая диссертационная работа, которая не вызывает ни одного вопроса с научной точки зрения, и все комментарии являются исключительно технические и касаются ее оформления. Так, в литобзоре можно отметить несколько избыточных англизмов: "промотирует", "репрессирует", имеющих устоявшиеся аналоги в русском языке. В разделе "Материалы и методы" на странице 51 компоненты растворов, концентрации которых представлены в величинах "моль/л" даны в виде кристаллогидратов, хотя в растворе очевидно гидраты не существуют. Можно наверное отметить и несколько неудачное описание разделяющего геля: "5% полиакриламида в смеси с 1/30 бисакриламида" - полиакриламид, синтезированный из смеси акриламида и бисакриламида в соотношении 1:29 (ПОЛИАкриламид не смешивают с мономером). В подразделе "транскриптомный анализ" было бы уместно указать место депонирования результатов и номер записи, что часто требуют при публикации статей. В тексте также есть несколько мест, где не указан ротор при описании центрифугирования, и условия описываются в об/мин. Наконец, стоило бы написать про статистическую обработку данных. Например, в разделе "Результаты" на странице 70 приведено сравнение времени удвоения штаммов, и величины приведены как  $xxx \pm xx$ . Это

приведены стандартные отклонения или стандартные ошибки? Каким было количество независимых экспериментов? Второй пример - отсутствие понимания у читателя о статистической значимости изменений, приведенных на Рис 22 и описанных в тексте на странице 87.

Вместе с тем очевидно, что указанные замечания не влияют на суть и не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 02.00.10 - «биоорганическая химия» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Плетнев Филипп Игоревич заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - «биоорганическая химия» (химические науки).

Официальный оппонент:

кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

ИВАНОВ Александр Владимирович

Подпись

11.01.2021



Адрес места работы:

119991, г. Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, д.32

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Тел.: +7 (495) 422-15-54 e-mail: aivanov@eimb.ru

Подпись Иванова А.В. удостоверено  
Ученый секретарь ИМБ РАН

Бочаров Р.Н.

