О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию Плетнёва Филиппа Игоревича “Новые особенности регуляции аппарата экспрессии генов в стационарной фазе бактериальной культуры *E.coli*”, представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Изучение регуляции экспрессии генов бактериальных клеток остаётся чрезвычайно важным для развития наук о жизни. Понимание тонкостей такой регуляции крайне необходимо не только для фундаментальной науки с точки зрения развития представлений о молекулярных механизмах, лежащих в основе регуляции жизненных процессов примитивных одноклеточных организмов, но также важно для разработки стратегии борьбы с бактериальными инфекциями. Рост бактериальных популяций описывается несколькими фазами, отличающимися друг от друга не столько скоростью деления клеток, сколько направлением внутриклеточных процессов и активностью тех или иных групп генов. Исторически на примере модельного организма *Escherichia coli* наиболее изученной оказалась логарифмическая стадия роста бактериальных клеток в условиях изобилия ресурсов, которые легко можно создать в лаборатории. Между тем, как сейчас стало понятно, наибольший интерес с практической точки зрения представляет именно стационарная фаза роста, когда клетка ограничена в ресурсах и вынуждена перенастраивать свой метаболизм для борьбы с голодом и агрессивными условиями окружающей среды. Именно в этой фазе роста клетка становится мишенью для антибиотиков и начинает искать пути борьбы с их действием, что приводит к возникновению новых более устойчивых штаммов. Поэтому получение новых знаний об особенностях регуляции экспрессии генов бактериальной клетки в условиях стационарной фазы роста крайне актуально для современного состояния науки, поскольку создание новых антибиотиков уже не может обеспечивать контроль особо опасных бактериальных инфекций, и в этом направлении требуется разработка новых подходов. В этой связи диссертационная работа Плетнёва Ф.И., посвящённая описанию новых особенностей регуляции экспрессии генов клеток *E.coli* в стационарной фазе, и в которой впервые проведено исследование влияния мутации в регионе σ1.1 на клеточный метаболизм является, безусловно, актуальной, новой и важной для развития данной области науки.

Диссертация изложена на 151 странице, содержит 38 рисунков и приложение с 2-мя таблицами. Сама работа построена классическим образом и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», а также «Список литературы» из 159 источников. Результаты работы представлены в трёх публикациях в виде статей в престижных международных рецензируемых журналах, в том числе в высокорейтинговом журнале Nucleic Acids Research, и апробированы в виде докладов на трёх международных конференциях.

В разделе «Введение» автор кратко излагает актуальность исследуемой проблемы, степень разработанности темы, цели и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость исследования, а также использованную в работе методологию. Здесь же даны основные положения, выносимые на защиту, и приведена информация об апробации работы, количестве публикаций и личном вкладе автора.

В обзоре литературы автор приводит современные представления и взгляды, касающиеся темы диссертационной работы. В частности, подробно рассмотрены характеристики стадий роста бактериальных культур и изменения клеточного метаболизма, сопровождающие переход клеток из одной стадии в другую. Описаны изменения в структуре и топологии клеточной ДНК, способы регуляции транскрипции в стационарной фазе, роль сигма-факторов в регуляции экспрессии генов. Большое место отведено имеющейся информации, касающейся механизма строгого ответа и регуляции трансляции в стационарной фазе и при голодании. Таким образом, читатель получает исчерпывающее представление о состоянии знаний и проблематике в области исследований, что помогает не только оценить в дальнейшем научный вклад автора, но и знакомит с терминологией, принятой в данном научном направлении, существенно облегчая знакомство с рукописью. Этот раздел диссертации демонстрирует широкий научный кругозор автора и его уверенное владение информацией в области своих исследований

В разделе «Материалы и методы» собрано описание использованных автором в работе химических реактивов, штаммов бактериальных культур, приведены составы буферных растворов, последовательности праймеров, и дано описание методов и экспериментальных процедур. Все приведенные методы описаны довольно подробно, что позволяет их воспроизвести или использовать в качестве лабораторного протокола.

Достижения автора собраны в разделе «Результаты». Этот раздел охватывает два направления исследований автора: выявление роли замены I48S в факторе σ^{70} клеток *E.coli* и изучение олигоглутамилирования рибосомного белка S6. В первой части раздела

приводятся результаты подробного и обстоятельного изучения влияния на жизнедеятельность *E.coli* обнаруженной автором мутации в гене *rpoD*, приводящей к вышеуказанной замене. Автором были созданы и охарактеризованы новые клеточные штаммы для изучения замены I48S в факторе σ^{70} и её влияния на рост клеток, их выживаемость и метаболическую активность. В этой части работы автор продемонстрировал свои незаурядные способности во владении методиками редактирования бактериальных геномов и создании новых штаммов клеток с заданными свойствами. С использованием штамма с указанной заменой было выявлено, что такие клетки обладают повышенной чувствительностью к антибиотикам в лаг-фазе. Для изучения фенотипических особенностей мутантного штамма был использован ряд нетривиальных методов, среди которых измерение уровня трансляции *de novo* в клетках по включению радиоактивно-меченого валина и использование флуоресцентного клеточного таймера – репортёрного белка FastFT, спектральные характеристики которого изменяются при созревании внутри клетки. В результате автору удалось наглядно показать влияние мутации T143D в гене *rpoD*, приводящей к замене I48S в факторе σ^{70}, на фенотип клеток *E.coli*. Далее, с использованием высокопроизводительного секвенирования автор показал ремоделирование регуляции трансляции в мутантном штамме. Был установлен ряд генов, экспрессия которых изменяется при переходе от логарифмической фазы роста к стационарной, и определены изменения в метаболических клеточных путях. Результаты высокопроизводительного секвенирования были валидированы с помощью количественной ПЦР. Наконец, в опытах *in vitro* было установлено влияние мутации I48S на активность РНК-полимеразы и показано, что данная мутация изменяет силу взаимодействия РНК-полимеразы с промоторами и приводит к изменению чувствительности РНК-полимеразы к действию факторов строгого ответа.

Вторая часть главы «Результаты» посвящена изучению модификации рибосомного белка S6 АТФ-зависимой L-глутамат лигазой RimK в стационарной фазе роста клеток. Автор справился с поставленными задачами и, с использованием полученного штамма, нокаутного по гену *rimK*, показал, что олигоглутамилирование белка S6 вызывается наступлением стационарной фазы, что значимость модификации обуславливается самим её наличием, а не количеством остатков глутамата, и что модификация белка S6 может происходить независимо от наличия специфичных факторов стационарной фазы. В целом, опыты, описанные в главе «Результаты», свидетельствуют о высоком экспериментальном мастерстве автора, его уверенном владении современными методами исследований и способности выполнять самые сложные научные задачи.

В главе «Обсуждение» автор критически осмысливает полученные результаты, сравнивает их с имеющимися в литературе данными и даёт сравнительную оценку своим достижениям. В некотором роде, эта глава подводит итог работе автора и рисует дальнейшую перспективу исследований в данной области.

Все достижения автора в данной работе в краткой форме сформулированы в виде 6 выводов, которые приведены в соответствующем разделе.

К сожалению, работа не свободна от недочётов, что несколько затрудняет оценить её по достоинству в полной мере. Основным недостатком является неудачный выбранный стиль оформления работы и небрежности в подаче материала, что, порой, делает не совсем понятным логику изложения. С самого начала, в названиях диссертаций, также как в заголовках статей, обычно принято приводить полное название вида. Далее, в частности, не понятно, почему нумерация ссылок в диссертации не является сквозной. Именно поэтому, видимо, в работе в ряде мест пропущены ссылки (например, на стр. 28, абз. 2 или на стр. 43, абз. 3). Также хотелось бы, чтобы описание каждого эксперимента в работе завершалось кратким умозаключением, чтобы было вполне ясно, какой из выводов работы автора следует из результатов данного конкретного эксперимента. Имеются вопросы по оформлению рисунка 15, где приведен радиоавтограф геля после разделения меченых белков электрофорезом. Во-первых, на нём отсутствует шкала молекулярных весов маркерных белков, а во-вторых, не понятно, зачем нужно было приводить изображение сразу для всех трёх реплик эксперимента? Если смысл заключался в демонстрации воспроизводимости результатов, то тогда следовало бы привести денситометрический обсчёт дорожек геля, примерно так, как это сделано на рис. 18, или дать статистическую обработку воспроизведений. Имеется также вопрос по описанию данных, представленных на рис. 17. Почему генетически однородные штаммы клеток в одинаковых условиях роста дают различные “популяции” при анализе проточной цитометрией? На рис. 25 на электрофореграмме не понятно, какие дорожки относятся к сшивкам сигма-фактора дикого типа, а какие к сшивкам его мутантной формы. Наконец, не понятно, почему в разделе «Материалы и методы» не приведены условия постановки экспериментов по сшивкам и измерению кругового дихроизма, описание которых дано на стр. 91 и 92? Из мелких замечаний можно отметить ряд неудачных фраз, например: “Среди дифференциально экспрессирующихся генов в логарифмической фазе наблюдалось достоверное обогащение множества регуляторных путей” (стр. 81).

Тем не менее, отмеченные недостатки, конечно, не носят принципиального характера, никоим образом не отражаются на значимости и ценности диссертационной работы и не влияют на её основные результаты и выводы. Автореферат полностью

соответствует содержанию диссертации, а результаты работы опубликованы автором в престижных международных журналах и доложены на международных и конференциях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Всё вышеизложенное позволяет заключить, что диссертация Плетнёва Филиппа Игоревича “Новые особенности регуляции аппарата экспрессии генов в стационарной фазе бактериальной культуры *E.coli*” 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, Плетнёв Филипп Игоревич, без сомнения, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия» (химические науки).

Официальный оппонент,
ведущий научный сотрудник
Лаборатории структуры и функции рибосом
ИХБФМ СО РАН
д.х.н., доц. Малыгин Алексей Аркадьевич

14.01.2021г.

Адрес: Институт химической биологии и фундаментальной медицины

Сибирского отделения Российской академии наук,

пр. Лаврентьева 8, г. Новосибирск, 630090

Тел.: +7-(383)-363-51-39

E.mail: malygin@niboch.nsc.ru

Подпись Малыгина Алексея Аркадьевича удостоверяю

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук
Подпись
Заверяю
Зав. канцелярией

Для документов