

ОТЗЫВ

Официального оппонента

на диссертационную работу Агаповой Юлии Константиновны «НУ белок из *Spiroplasma melliferum*: структурная организация, специфичность ДНК-связывания и низкомолекулярные ингибиторы», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3- «Молекулярная биология»

Представленная к защите работа Агаповой Юлии Константиновны посвящена изучению природного разнообразия НУ белков, сравнительному анализу ДНК связывающей способности НУ белков микоплазменного и не микоплазменного происхождения, а также структурному анализу и поиску низкомолекулярных ингибиторов микоплазменного НУ белка из *Spiroplasma melliferum*.

Пространственная организация геномной ДНК имеет большое значение для регуляции всех процессов, связанных с хранением и реализацией генетической информации, не только в ядре эукариотической клетки, но и в гораздо более просто устроенном бактериальном нуклеоиде. За поддержание пространственной структуры нуклеоида отвечают нуклеоид-ассоциированные белки (НАБ). Гистоноподобный НУ белок является наиболее консервативным и наиболее представленным НАБ бактериальной клетки. Кроме того, НУ белки отсутствуют в эукариотической клетке и поэтому могут служить фармакологическими мишенями для разработки антибактериальных препаратов, востребованных в медицине и ветеринарии.

Диссертационная работа Агаповой Ю.К. представляет собой хорошо спланированное и логично выстроенное исследование. Положения, выносимые на защиту, соответствуют полученным результатам и сформулированным выводам. Использование современных методов молекулярной биологии, достаточное количество биологических повторов экспериментов подтверждают достоверность результатов диссертационного исследования. Результаты диссертации представлены в 9 статьях в научных

журналах (WoS, Scopus, РИНЦ), а так же 18 тезисах докладов на конференциях. Был получен один патент. Особо стоит отметить две статьи в журнале Scientific Reports и одну в журнале PLoS One.

Работа написана по традиционной схеме, и изложена на 109 страницах. Она состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, который содержит 164 источника. Диссертация содержит 27 рисунков и 16 таблиц.

Обзор литературы демонстрирует глубокое знание материала, опубликованного по тематике диссертации, он хорошо написан и проиллюстрирован. Обзор начинается с описания нуклеоид-ассоциированных белков *E. coli* и рассказа об их основных свойствах и особенностях. Далее автор переходит к более подробному описанию гистоноподобного (HU) белка, знакомя нас с его характеристиками, пространственной структурой, механизмами взаимодействия с нуклеиновыми кислотами, а также с его внеклеточными функциями и их связью с патогенезом бактерий. Очень интересные данные этого раздела касаются секреции белков и их влияния на образования биопленок. В завершении литературного обзора обсуждается фармакологический потенциал HU белка и рассматриваются работы, посвящённые разработке низкомолекулярных ингибиторов ДНК-связывающей функции HU белка, обладающих антибактериальной активностью.

В разделе «Материалы и методы» автор достаточно подробно описывает экспериментальные подходы и методы, использованные в работе для получения результатов в соответствии с поставленными задачами. Раздел написан очень подробно и позволяет воспроизвести все перечисленные эксперименты.

Раздел «Результаты и обсуждения» посвящен описанию полученных данных, их обсуждению и сравнению с литературными данными. Он

разделен на четыре подраздела. Первый посвящен биоинформатическому анализу аминокислотных последовательностей гистоноподобных белков бактерий и выбору объектов исследования. Затем в работе описывается получение белковых препаратов и проводится сравнительный анализ ДНК-связывающих свойств исследуемых гистоноподобных белков. Третий раздел рассказывает о получении пространственной структуры NU белка из *S. melliferum* и исследовании его термостабильности. Структурный анализ в совокупности с исследованиями термостабильности белка дикого типа и мутантных форм позволил выявить ключевые детерминанты высокой термостабильности белка. Кроме того, полученная пространственная структура была использована для поиска низкомолекулярных ингибиторов в библиотеке химических соединений. В работе была установлена способность бисфенольных производных флуорена (БПФ) ингибировать ДНК-связывающие свойства NU белков и предложен механизм их действия.

Замечания и вопросы в работе

Диссертационная работа очень хорошо, логично и четко написана, все выводы исследования полностью подкрепляются представленными экспериментальными данными. Тем не менее, как и любое другое исследование, она вызывает ряд технических вопросов и предложений об оформлении.

1. Основной возникающий вопрос касается выбора метода для анализа взаимодействия между белками и ДНК-дуплексами. В данной работе автор выбрал достаточно трудоемкий метод анализа комплексов торможениями в полиакриламидном геле. В то же время более производительным методом мог быть дот-блот, заключающийся в фильтровании реакционных смесей последовательно через нитроцеллюлозную и нейлоновую мембраны. На первой будет задерживаться комплекс меченой ДНК и белка, а на второй – свободная нуклеиновая кислота. Этот метод

дает простые для обсчета данные. Каким преимуществом обладал метод анализа комплексов в геле?

2. Несмотря на большое количество экспериментов, диссертант не обсуждает стехиометрию взаимодействия и его кооперативность.
3. В Экспериментальной части имеется некоторое количество технических недочетов. Так, в таблице 6 говорится о том, что раствор уксусной кислоты имел рН 7,5, в таблице 7 не приведено соотношение акриламида и бисакриламида - важный параметр гелей. Не очень корректным является перевод английской аббревиатуры NEPES на русский язык, а также использование англицизма «глицерол» вместо распространенного слова «глицерин». Наконец, в подразделе про выделение белков желательно было бы указать, ингибиторы каких именно протеинкиназ использовали в работе.
4. Описание наработки и выделения рекомбинантных белков правильнее было бы сопроводить таблицей с выходами каждого из них.

Однако в целом, данные замечания относятся скорее к представлению и интерпретации экспериментальных данных, а не к их качеству, и никаким образом не умаляют высокой научной значимости и практической ценности полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы Агаповой Ю.К.

Таким образом, диссертационная работа Агаповой Юлии Константиновны «HU белок из *Spiroplasma melliferum*: структурная организация, специфичность ДНК-связывания и низкомолекулярные ингибиторы» соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650;

20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология."

Официальный оппонент:

Иванов Александр Владимирович

Заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук.

Доктор биологических наук.

119991, г. Москва,

ул. Вавилова, д. 32.

Тел. 8(499)135-23-11.

E-mail: isinfo@eimb.ru

Подпись Александра Владимировича Иванова заверяю

Ученый секретарь ИМБ РАН,

К.В.Н.

Бочаров Александр Анатольевич

20 февраля 2024 г.

