

ОТЗЫВ

Официального оппонента

на диссертационную работу Агаповой Юлии Константиновны «HU 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»

Актуальность выполненной работы

Правильная упаковка и структурирование генома, необходимые для поддержания его целостности у бактерий, требуют специальных белков. Нуклеоид-ассоциированные белки (NAPs), включая LRP, FIS, H-NS, IHF и HU, вовлечены в упаковку и образование суперспирализации ДНК. Они модулируют важнейшие клеточные функции, такие как репликация, рекомбинация, репарация и транскрипция клеточной ДНК. Каждый вид бактерий характеризуется своим набором NAPs, при этом только HU-подобные белки имеют повсеместное распространение среди бактериальных микроорганизмов. Гистоноподобные свойства белка HU заключаются в его способности вносить, как это делает гистоновый октамер, отрицательную суперспирализацию в релаксированную замкнутую кольцевую молекулу ДНК в присутствии топоизомеразы I и конденсировать ДНК, а также связывать ДНК неспецифически. В большинстве бактерий отсутствие HU белка снижает адаптационные способности и патогенность, но не приводит к гибели, так как компенсируется другими белками нуклеоида. Для бактерий класса *Mollicutes*, к которым в частности относятся такие роды как *Mycoplasma* и *Spiroplasma*, отсутствие HU белка становится летальным. Предполагается, что HU белок способен функционально замещать компоненты системы репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (Mismatch repair), которые отсутствуют у многих представителей класса *Mollicutes*.

Грам-положительные микроорганизмы, принадлежащие к классу *Mollicutes*, представители которого не имеют клеточной стенки и являются

наименьшими по размеру известными бактериями, способными к самостоятельному существованию. Для них характерны: значительная редукция генома, размеры которого варьируют от 580 тыс. до 1.4 млн. пар оснований; низкое содержание Г-Ц оснований (31 % для *M. gallisepticum*).

Микоплазмы, являясь представителями класса *Mollicutes*, вызывают заболевания человека и сельскохозяйственных животных, которые плохо поддаются лечению антибиотиками. Кроме того, данные микроорганизмы способны заражать клеточные культуры, что создает препятствия для применения клеточных технологий в рамках научных исследований и биотехнологического производства. В связи с важной ролью белка HU в клетках микоплазм, изучение структурно-функциональных особенностей их HU белков может способствовать развитию новых способов борьбы с микоплазменными инфекциями.

Научная новизна и практическая значимость

В работе был проведен биоинформатический анализ, который позволил расширить представление о семействе белков HU в целом и о белках этого типа у микоплазм, в частности. Полученная с высоким разрешением пространственная структура HU белка из *Spiroplasma melliferum* была использована для выявления структурных детерминант термостабильности, а также для поиска низкомолекулярных ингибиторов ДНК-связывающей активности исследуемого белка методом молекулярного докинга. Была впервые установлена способность бисфенольных производных флуорена блокировать связывание ДНК белком HU, а также замедлять рост микоплазмы в культуре. Кроме того, в представленной работе было продемонстрировано отсутствие конкуренции между ингибитором и ДНК за сайт связывания белка HU, что, по мнению автора, указывает на потенциальную возможность применения подобных ингибиторов в качестве основы для разработки антибактериальных препаратов, нарушающих архитектуру нуклеоида.

Степень обоснованности и достоверности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Для решения поставленных в работе задач, автором были применены широкий арсенал методов молекулярной биологии, физической химии и биоинформатики, включая анализ изменения электрофоретической подвижности ДНК (EMSA), дифференциальную сканирующую калориметрию, изотермическую титрационную калориметрию, множественные выравнивания белковых последовательностей и кластерный анализ. В результате работы был получен значительный объем экспериментальных и теоретических данных. Представленные в работе результаты выглядят достоверно, сделанные выводы в целом обоснованы и подтверждены соответствующими экспериментами. Результаты работы были опубликованы в 9 статьях и представлены на 18 российских и международных конференциях. Был получен один патент. Представленные в автореферате результаты полностью отражают проведенные исследования.

Оценка содержания диссертации

Диссертация построена по традиционному плану. Основными частями диссертации являются: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы.

Подавляющая часть результатов работы получена лично автором. Работа иллюстрирована 27 рисунками, содержит 16 таблиц. Выводы обоснованы фактическим материалом и в полной мере отражают результаты исследования. Библиографический список включает 164 литературных источника соответствующих статьям и обзорам российских и зарубежных авторов.

Литературный обзор состоит из следующих глав: «Нуклеоид-ассоциированные белки бактерий» и «Гистоноподобный белок HU». В первой главе описываются основные характеристики нуклеоид-ассоциированных белков, выделяются их основные группы и конкретные представители. Во второй главе делается акцент непосредственно на HU белках. В данной главе приводится характеристика пространственной структура белка HU,

указывается информация о взаимодействии с нуклеиновыми кислотами. В дальнейшем изложении автор описывает внеклеточные функции исследуемого белка, а также отмечает его связь с патогенезом бактерий. В заключительной части литературного обзора автор уделяет внимание возможному использованию белка HU в качестве мишени для создания таргетной антибактериальной терапии.

В разделе «Материалы и методы» приводится подробное описание использованных в работе методик в достаточной для воспроизведения представленных в работе результатов форме.

Глава «Результаты и их обсуждение» содержит результаты проведенных экспериментов и теоретических исследований, проводится их анализ, в том числе на соответствие с ранее опубликованными литературными данными. В начале работы автор проводит биоинформатический анализ аминокислотных последовательностей гистоноподобных белков у бактерий и осуществляет отбор объектов для дальнейшего исследования. Затем описывается процесс получения очищенных белковых препаратов для последующего сравнительного анализа ДНК-связывающих свойств HU белков. После чего автор переходит к результатам рентгеноструктурного анализа. В итоге была разрешена структура HU белка из *Spiroplasma melliferum*. Анализ полученной структуры позволил предположить, а затем и экспериментально показать основные факторы высокой термостабильности исследуемого белка. Кроме того, полученная пространственная структура была применена для поиска низкомолекулярных ингибиторов в химической библиотеке Vitas-M laboratories. В результате исследования была выявлена способность бисфенольных производных флуорена ингибировать ДНК-связывающие свойства HU белков, а также предложен механизм действия ингибиторов данного класса.

Вопросы и замечания по диссертации

В результате прочтения текста диссертации и автореферата были сформулированы несколько замечаний.

1. В формулировке задач и выводов имеются некоторые расхождения: первой задачей автор ставит «Биоинформатический анализ близкородственных гистоноподобных белков бактерий (HU и IHF). Отбор модельных HU белков для функциональных исследований». При этом в выводах прямо не говорится, что такой выбор осуществлен, хотя это и понятно по смыслу, но все же имеется формальная погрешность.
2. Имеются несколько пунктуационных ошибок - в некоторых местах пропущены необходимые знаки препинания.
3. Некоторые из представленных рисунков имеют подписи на английском и русском языке одновременно.
4. Имеются небольшие отклонения в оформлении списка публикаций от рекомендуемых стандартов.
5. Автор несколько раз использует выражение “MMR-mismatch repair”, хотя обычно в литературе используют либо “MMR”, либо “mismatch repair”, то есть получается двойной повтор одного и того же.
6. В актуальности работы автор говорит о том, что микоплазмы вызывают заболевания человека, но в качестве основного объекта фокусируется на HU-белке *Spiroplasma melliferum*. Данная бактерия относится к одному с микоплазмами классу - *Mollicutes*, но входит в совершенное другое семейство и является паразитом пчел. При этом в тексте работы автор указывает, что HU белок из *S. melliferum* был наиболее интересен тем, что имел наибольшее число отличий от белка из *E.coli*. Хотелось бы спросить у автора, почему основные исследования были посвящены именно белку из спироплазмы, хотя более актуальным кажется исследование структуры HU-белка человеческих патогенов из рода микоплазм?
7. Автором в ходе работы была показана ингибирующая активность бисфенольных производных флуорена по отношению к способности белка HU связывать ДНК. Насколько значения полученных констант связывания позволяют рассматривать данные соединения в качестве потенциально терапевтических?

Приведенные замечания и вопросы, хотя и нуждаются в пояснениях, но не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы Агаповой Ю.К.

Таким образом, диссертационная работа Агаповой Юлии Константиновны «НУ 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:

Горбачев Алексей Юрьевич



Заведующий лабораторией протеомного анализа Федерального государственного бюджетного учреждения "Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства".

Кандидат биологических наук

119435 Москва, улица Малая Пироговская, 1а, Тел. 8 (926) 467-87-82. E-mail: gorbachev.a@grscm.ru

Подпись к.б.н. Горбачева А.Ю. ЗАВЕРЯЮ:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения "Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства России"

к.б.н. Кострюкова Е.С.

22 февраля 2024 г.

