

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФБУН НИИ СБМ
Роспотребнадзора
д.б.н., профессор, академик РАН
Говорун Вадим Маркович

«19»  2024 г.

ОТЗЫВ

**Федерального бюджетного учреждения науки «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины»
Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 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»**

Актуальность темы диссертационной работы

ДНК-связывающие НУ белки присутствуют во всех бактериях и относятся к семейству белков, ассоциированных с бактериальным нуклеоидом (NAPs). Они отвечают за поддержание компактизации ДНК клеток прокариот, а также за регуляцию ДНК-зависимых процессов. Так же НУ-белки являются хорошей моделью для изучения структурных основ термостабильности.

В 2014 году было показано, что низкомолекулярные ингибиторы, разработанные на основе структуры НУ белка из *Mycobacterium tuberculosis*, могут нарушать структуру нуклеоида и замедлять рост бактерий. Это, а так же факт того, что НУ белок присутствует во всех бактериях, но отсутствует в эукариотических клетках, делает его

потенциальной мишенью для разработки антибактериальных препаратов в медицине и ветеринарии.

Научная новизна исследования

В научном отношении диссертационная работа Агаповой Ю.К. отличается высокой степенью новизны и оригинальности. Автором был в впервые проведен биоинформатический анализ нескольких тысяч гистоноподобных белков (НУ и ИНФ). Было показано, что каждый НУ белок имеет индивидуальный профиль сродства к различным ДНК-структурам. Благодаря сравнительному анализу пространственной структуры НУ белка из *Spiroplasma melliferum*, дополненному исследованиями термостабильности белка дикого типа, были выделены аминокислотные остатки, ответственные за высокую термостабильность белка. С использованием метода виртуального скрининга были обнаружены и получены новые ингибиторы НУ белков. Так же автору удалось предложить новый механизм связывания ингибитора с белком.

Обоснованность и достоверность научных результатов и выводов диссертационной работы

Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне с использованием современных методов. Результаты экспериментов описаны подробно и последовательно. Достоверность результатов подтверждается публикациями и выступлениями на международных конференциях. По теме работы было опубликовано 9 статей, в рецензируемых научных журналах (WoS, Scopus, РИНЦ), а так же 18 тезисов докладов на конференциях. Был получен один патент. Выводы, полученные в результате работы и обоснованные экспериментальными данными, соответствуют целям и задачам. Автореферат отражает основное содержание работы.

Научно-практическая значимость работы

Диссертационная работа несет как теоретическую, так и практическую значимость. В работе описана первая пространственная структура НУ белка спироплазмы, а также проведён сравнительный анализ структурно-

функциональных особенностей NU белков микоплазменного и не микоплазменного происхождения. В практическом плане, работа открывает перспективы для дальнейшего поиска и изучения низкомолекулярных ингибиторов NU белков, которые могут быть использованы для разработки антибактериальных препаратов.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Агаповой Ю.К. изложена на 109 страницах и включает разделы: «Введение», «Литературный обзор», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждения», «Заключение и выводы» и «Список литературы». Работа содержит 27 рисунков и 16 таблиц. Список литературы включает 164 наименования.

Во введении отражена актуальность темы, научная новизна и практическая значимость. Формулируются цель и задачи исследования, приведены положения, выносимые на публичное представление, степень достоверности и апробация результатов. В главе «Литературный обзор» рассматриваются основные классические и современные исследования по теме диссертационной работы. Автором проведен тщательный отбор и анализ литературных источников (в основном, зарубежных), позволяющий понять как изменялись представления о структуре и механизмах работы бактериальных NU белков. В главе «Материалы и методы» подробно описаны экспериментальные процедуры и используемые химические реагенты, ферменты и наборы. Глава «Результаты и обсуждения» хорошо структурирована и включает информацию о методах и результатах диссертационного исследования. В этой главе приводятся сравнение полученных результатов с современными литературными данными. На основе полученных результатов формулируются выводы в соответствии с заявленной целью, задачам и положениями. Содержание диссертации соответствует содержанию автореферата и опубликованным статьям. Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационной работы.

Замечания по содержанию диссертации

Диссертантом в своей работе был сделан акцент на изучении HU-белков четырех разных микроорганизмов: двух представителей класса молликут, кишечной палочки и бактерии *Neisseria gonorrhoeae* (к сожалению, отсутствуют названия штаммов бактерий). Хотелось бы в тексте диссертации побольше получить информации о причине выбора именно этих объектов для изучения. Какова гомология HU-белков у данных бактерий? Кроме того, для выбранных микроорганизмов существенно отличается ареал обитания и условия культивирования. Так, для спироплазм в естественной среде отмечены два хозяина: насекомые и растения, и характерной температурой культивации для них является 28-30 °С. В свою очередь, для *Mycoplasma gallisepticum* типичным хозяином является домашняя птица, нормальной температурой которой является 42°С. Хотелось бы, что бы в данной работе было больше уделено внимания температурным особенностям исследуемых объектов, поскольку при разной температуре может отличаться характер связывания HU-белка с ДНК. Существенным дополнением к работе был бы анализ температуры плавления комплекса HU-белка с ДНК. Было бы интересно сравнить изотермы стабильности комплекса из разных микроорганизмов при разных температурах.

Было бы интересно узнать мнение автора, почему для HUSpm наблюдается высокая термостабильность по сравнению с другими исследуемыми в работе белками. Зачем это необходимо с биологической точки зрения? Это особенно интересно в контексте того, что по сравнению с другими выбранными объектами, *Spiroplasma melliferum* живет при более низких температурах.

Для оценки связывания белка с ДНК использовался хоть и хорошо себя зарекомендовавший, но архаичный метод торможения в геле, в результате постановки которого могут появляться различные артефакты. Хотелось бы, чтобы ряд результатов был подтвержден ортогональным методом. Кроме того,

рисунок 13 в тексте диссертации труден для восприятия (знаки минус сверху рисунка практически сливаются с границей лунок геля).

При расчете констант диссоциации были ли взяты во внимание данные об аномальном содержании АТ-оснований в молликутах?

При создании мутантных вариантов NU-белка проводился ли контроль сохранности правильной их вторичной и третичной структуры физическими (снятие КД-спектра) и/или расчетными методами?

Для оценки влияния ингибиторов на рост *M. gallisepticum* и *S. melliferum* в культуре применялся тест микроразведений в бульоне. Но данный метод в большей степени свидетельствует об уровне метаболизма клеток (за счет изменения цвета индикатора в среде при ее закислении), а не о количестве клеток. Для более уверенных выводов о влиянии БПФ на гибель бактерий лучше определять количество клеток высевом на полужидкую/твердую питательную среду.

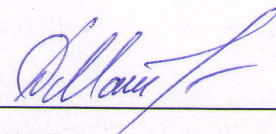
Однако, несмотря на сделанные замечания, несомненно работа Агаповой Ю.К. является интересным законченным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне.

Заключение

Диссертационная работа Агаповой Юлии Константиновны «NU 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."

Отзыв о научно-практической значимости диссертации обсужден и одобрен на семинаре отдела системной и синтетической биологии (протокол №1 от 14 февраля 2024 г.)"

Отзыв подготовила Матюшкина Дарья Сергеевна,
кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории простых систем



Матюшкина Д.С.

Федеральное бюджетное учреждение науки «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

117246, Москва, Научный проезд, д. 18

+7(495) 332-0101,

info@sysbiomed.ru

<https://sysbiomed.ru/>

Подпись Матюшкиной Д.С. удостоверяю.

Ученый секретарь

ФБУН НИИ СБМ Роспотребнадзора

К.М.Н



Белялетдинова И. Х.