

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Сюткина Алексея Сергеевича
«Изучение молекулярной организации жгутиков *Haloarcula marismortui*»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

Диссертационная работа Алексея Сергеевича Сюткина посвящена важной и интересной проблеме – выяснению особенностей строения, сборки и функционирования двигательного аппарата галофильных архей – жгутиков, на примере галофильного археона *Haloarcula marismortui*. Аппарат жгутиковой подвижности является одним из уникальных свойств архей. Несмотря на внешнее сходство с бактериальными жгутиками, жгутики архей принципиально отличаются от них по целому ряду свойств – особенностям молекулярной организации, механизму сборки и происхождению. В настоящее время уже не вызывает сомнения тот факт, что жгутики архей являются уникальной системой биологической подвижности, отличной от аппарата подвижности бактерий. Следует отметить, что археи были выделены в отдельный домен живой природы (наряду с эукариотами и бактериями) лишь совсем недавно, в конце 70-х годов XX века, и вследствие этого исследования аппарата их биологической подвижности начали интенсивно проводиться лишь в последние десятилетия. Таким образом, диссертационная работа А.С. Сюткина, в которой проведены исследования жгутиков архей и получены новые оригинальные данные, является вполне своевременной.

Актуальность темы диссертации

Выше уже указывалось, что интенсивные исследования аппарата биологической подвижности архей начали проводиться лишь совсем недавно. Поэтому не удивительно, что как в плане строения, так и в плане функционирования жгутик архей является все еще крайне малоизученной структурой по сравнению с достаточно подробно изученным бактериальным жгутиком. Имеющиеся к настоящему времени данные уже свидетельствуют о том, что жгутики архей представляют собой уникальную систему биологической подвижности и принципиально отличаются от бактериальных жгутиков по целому ряду свойств – как по особенностям молекулярной организации, так и по механизму сборки. Исследования в этом направлении интенсивно ведутся в последнее время во многих лабораториях. Поэтому не вызывает никаких сомнений актуальность предпринятого диссертантом исследования, одной из главных целей которого стала проверка универсальности постулированного ранее принципа, согласно которому для построения спирального филамента жгутика галофильных архей необходимо как минимум два разных флагеллина – белка, образующего жгутик. Важно сразу отметить, что в результате проведенной работы диссертанту удалось опровергнуть этот принцип и убедительно показать, что филаменты жгутиков галофильных архей могут строиться только из одного типа субъединиц флагеллина. При выполнении работы А.С. Сюткиным был получен и целый ряд иных новых интересных данных о структуре и свойствах жгутиков архей. Считаю, что актуальность данного исследования не подлежит сомнению.

1. Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы.

На основании многочисленных экспериментов в диссертационной работе А.С. Сюткина был получен целый ряд новых интересных результатов, достоверность которых не вызывает сомнений. На основании этих результатов автором работы было сделано 6 основных выводов, которые вполне адекватно отражают главные достижения диссертанта. Важно отметить, что в данной работе впервые было показано наличие подвижности у галофильного археона *H. marismortui*, который ранее принято было считать неподвижным. Автору удалось обнаружить целый ряд особенностей жгутиков этого организма – например то, что они существенно толще жгутиков всех ранее изученных архей, видимо вследствие того, что они построены из более крупных флагеллинов, которые при этом являются гликопротеинами с необычным типом гликозилирования. В результате тщательно проведенных экспериментов автору диссертации удалось показать, что культура *H. marismortui* может содержать клетки, отличающиеся белковым составом филаментов жгутиков, но при этом спиральные филаменты жгутиков могут собираться лишь из одного типа флагеллиновых субъединиц. Это впервые свидетельствует о том, что механизмы формирования спиральности жгутиков галофильных архей могут быть весьма разнообразными и для построения спирального филамента жгутика совершенно не обязательно наличие как минимум двух разных флагеллинов, как это считалось ранее. Помимо этого, на основании представленных данных автором диссертации впервые выдвинута интересная гипотеза о том, что множественность флагеллиновых генов у архей вполне может быть специальным механизмом адаптации этих организмов к меняющимся условиям окружающей среды.

2. Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики.

Помимо того, что работа выполнена на высоком экспериментальном уровне с привлечением самых современных методов исследования, в ней разработаны новые методические подходы для таких исследований, при помощи которых получены новые оригинальные данные. Нет сомнений, что такие подходы найдут свое успешное применение и в дальнейших исследованиях по данному направлению. Полученные данные имеют большое теоретическое значение, поскольку выяснение принципов формирования надмолекулярных структур является одной из важнейших задач современной биологии. Результаты работы также имеют и немалое практическое значение, поскольку понимание взаимосвязи между свойствами индивидуальных субъединиц и формируемой ими надмолекулярной структуры может позволить в дальнейшем целенаправленно изменять свойства природных ансамблей субъединиц и создавать, к примеру, искусственные нановолокна с заданными свойствами на основе жгутиков архей, обладающих повышенной устойчивостью к диссоциирующим воздействиям.

3. Содержание диссертации

Диссертационная работа А.С. Сюткина построена по традиционному плану. Она изложена на 122 страницах и содержит 33 рисунка и 2 таблицы. Диссертация состоит из общего введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования,

результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 147 ссылок.

Обзор литературы состоит из 4 разделов. В первом из них рассматривается жгутиковая подвижность бактерий, причем особое внимание уделено принципам строения и сборки бактериального жгутика. Это вполне закономерно, поскольку позволяет впоследствии сопоставлять жгутики архей с бактериальными жгутиками. Во втором разделе приводится краткая характеристика бактериальных пилей IV-го типа, что также вполне закономерно, поскольку жгутики архей имеют ряд общих свойств (в том числе, по характеру сборки) именно с такими пилями бактерий, а не с бактериальными жгутиками. В третьем разделе обзора подробно рассматривается накопленный к настоящему времени материал о жгутиковой подвижности архей, включая особенности организации генов аппарата их подвижности, регуляции сборки их жгутиков и т.д. И, наконец, в четвертом разделе кратко рассматриваются другие поверхностные структуры архей. В целом, обзор литературы производит хорошее впечатление. Он написан хорошим языком, четко и логично, содержит ссылки на публикации последних лет, читается с большим интересом и наглядно свидетельствует о том, что диссертант прекрасно ориентируется в имеющейся литературе по рассматриваемым вопросам. Помимо этого, обзор полностью выполняет и свою главную функцию – он хорошо готовит читателя к последующему восприятию экспериментального материала.

В **методической части** достаточно подробно описаны методы получения главного объекта исследования – жгутиков архей *H. marismortui*. Помимо этого, здесь подробно описаны освоенные автором диссертации многочисленные методы исследования. Поражает обилие разнообразных методов и подходов, примененных автором диссертации для выполнения поставленных задач, – от методов генной инженерии, молекулярной биологии и различных биохимических методов исследования (различные виды электрофореза, в том числе с использованием иммуноблоттинга или специфического окрашивания гелей для идентификации гликопротеинов, ионообменная и гель-хроматография и т.д.) до таких методов исследования, как дифференциальная сканирующая калориметрия, масс-спектрометрия и электронная микроскопия. Такое успешное сочетание самых разных методов исследования является, безусловно, важной особенностью данной работы. Последующее ознакомление с результатами проведенного исследования убедительно свидетельствует о том, что диссертант в совершенстве овладел всеми этими методами.

Последующая глава **«Результаты исследования и их обсуждение»** состоит из двух неравных разделов, главным из которых является раздел 6, посвященный собственно изучению особенностей молекулярной организации жгутиков *H. marismortui*. Варьируя условиями выращивания, автору удалось получить два разных штамма *H. marismortui*, условно названные как FlaA2-штамм и FlaB-штамм, клетки которых содержали жгутики, состоящие из разных типов флагеллина, причем жгутики каждого из штаммов состояли из единственного типа субъединиц флагеллина. Именно на основании этих данных был сделан важный вывод о том, что для построения спирального филамента жгутиков с галофильных архей совершенно не обязательно наличие как минимум двух разных флагеллинов, как это считалось ранее, а достаточно лишь одного типа флагеллина.

Особый интерес вызывают результаты экспериментов по исследованию структуры и свойств жгутиков этих штаммов *H. marismortui* и сравнению их как между собой, так и со

жгутиками других галофильных архей (например, с изученными ранее жгутиками *H. salinarum* или со жгутиками *Halorubrum lacusprofundi*, результаты исследования которых приведены в разделе 7). Представленные данные убедительно свидетельствуют о том, что жгутики *H. marismortui* заметно толще жгутиков других архей – как ранее исследованных жгутиков *H. salinarum*, так и жгутиков *H. lacusprofundi*, исследованных в данной работе, а молекулярная масса составляющих их флагеллинов почти в 2 раза больше, чем у других архей. Автор сделал вполне разумное предположение, что флагеллины *H. marismortui* являются, по-видимому, продуктом дупликации и последующего слияния более типичных небольших флагеллинов. В этой связи очень интересны данные по изучению методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) тепловой денатурации жгутиков *H. marismortui* (как из FlaA2-штамма, так и из FlaB-штамма, рис. 19 на стр. 73), в которых показано, что эти жгутики демонстрируют на термограммах ДСК сразу два хорошо разрешенных пика теплопоглощения – в отличие от жгутиков других архей, для которых характере лишь один тепловой переход. Более того, автору удалось путем частичной необратимой денатурации части белка при прогреве препарата до температуры менее термостабильного теплового перехода и последующего протеолиза трипсином выделить в очищенном виде стабильный фрагмент с молекулярной массой около 30 кДа, который демонстрировал кооперативный тепловой переход на термограмме ДСК (рис. 26). Это в определенной мере подтверждает высказанное автором предположение, что флагеллины *H. marismortui* являются, по-видимому, продуктом слияния двух небольших флагеллинов. Данный результат особенно важен тем, что в настоящее время пока еще вообще отсутствуют данные по пространственной структуре архейных флагеллинов, и первым исключением из этого правила является как раз полученный в работе стабильный фрагмент флагеллина FlaB-штамма *H. marismortui*, который вполне можно будет использовать для кристаллизации и последующего определения трехмерной структуры (что и предполагается сделать в дальнейшем).

Немалый интерес вызывает и та часть работы, в которой автор пытался выяснить, для чего *H. marismortui* нужны два гена флагеллина, хотя функциональный жгутик может строиться только из одного типа флагеллина. В разделе 6.7 представлены данные, которые достаточно убедительно свидетельствуют о том, что такая избыточность по генам флагеллинов может играть весьма важную роль, поскольку наличие плазмиды, несущей ген FlaA2-флагеллина, позволяет клеткам сохранять подвижность даже в тех условиях, при которых FlaB-флагеллин не способен формировать нить жгутика. Эти данные впервые позволяют пролить свет на ту важную роль, которую играет множественность флагеллиновых генов у архей, а именно, она может способствовать адаптации этих организмов к меняющимся условиям окружающей среды.

Диссертация завершается заключением, в котором проводится анализ полученных результатов, на основании которого высказывается ряд интересных предположений о той роли, которую играют особенности строения жгутиков *H. marismortui* (включая и посттрансляционные модификации (гликозилирование) субъединиц флагеллина) в обеспечении подвижности этих галофильных архей. Этот раздел наглядно свидетельствует о способности автора диссертации как к творческому сопоставлению получаемых результатов с имеющимися в литературе данными и представлениями по рассматриваемым вопросам, так и к критическому анализу собственных результатов.

Подводя итоги, следует отметить, что рецензируемая диссертационная работа представляет собой полноценное завершённое исследование, в котором получены новые интересные данные об особенностях молекулярной организации жгутиков архей. Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, с привлечением современных методов исследования; В целом, диссертация производит самое благоприятное впечатление; материал ее изложен очень логично, четким и ясным языком.

У меня имеются некоторые вопросы и замечания к главе «Результаты исследования и их обсуждение» и все они касаются описания экспериментов, проведенных методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), и интерпретации результатов, полученных этим методом (разделы 6.2 и 6.6). Так, на стр. 73 при описании результатов, приведенных на рис. 19, написано: «Повторное прогревание как частично (пик 1), так и полностью (пик 2) денатурированных образцов жгутиков *H. marismortui* показало полную необратимость процесса тепловой денатурации». На этом рисунке хорошо видно, что для каждого из исследованных препаратов жгутиков (FlaA2 и FlaB) наблюдается два пика теплопоглощения – при относительно низких температурах (при 72°C для FlaA2-жгутиков и при 55°C для FlaB-жгутиков) и при высоких температурах (при 80°C для FlaA2 и при 84°C для FlaB). Из приведенной выше фразы остается совершенно непонятным, как прогревание образцов до температуры денатурации первого, менее термостабильного теплового перехода может приводить к «полной необратимости процесса тепловой денатурации» всего белка. Судя по всему, автор имел в виду полную необратимость денатурации лишь той части белка, которая разворачивается при относительно низких температурах (пики 1 на рис. 19). В противном случае невозможно объяснить данные ДСК, представленные на стр. 85 (рис. 25 и 26), когда после прогрева FlaB-жгутиков до температуры, соответствующей плавлению первого пика теплопоглощения (55–60°C), и последующего протеолиза трипсином значительная часть белка сохранялась от протеолиза в виде фрагмента с молекулярной массой около 30 кДа, который демонстрировал на термограмме ДСК кооперативный пик теплопоглощения с максимумом около 65°C (рис. 26). Кстати, при описании этих данных ДСК следовало все-таки указать, какую именно молекулярную массу использовали для расчета удельной молярной теплоемкости – массу исходного флагеллина (около 45 кДа) или же массу его исследуемого фрагмента (около 30 кДа); иначе довольно трудно сопоставлять данные ДСК, представленные для FlaB-жгутиков (рис. 19) и для этого фрагмента (рис. 26).

Видно, что все высказанные вопросы и замечания либо касаются оформления диссертации, либо носят сугубо полемический характер, нисколько не влияя при этом на общую высокую оценку выполненной А.С. Сюткиным диссертационной работы.

4. Опубликование результатов диссертации в научной печати

Материалы диссертации достаточно полно отражены в 12 публикациях. Основные результаты опубликованы в отечественной и международной периодической печати – в 3 статьях в журналах «Canadian Journal of Microbiology», «Микробиология» и «Extremophiles» (важно при этом отметить, что в двух последних статьях А.С. Сюткин является первым автором), а также доложены на международных съездах, симпозиумах и конференциях.

5. Содержание автореферата

Представленный автореферат диссертации по содержанию полностью соответствует диссертации.

6. Заключение

Диссертационная работа А.С. Сюткина «Изучение молекулярной организации жгутиков *Haloarcula marismortui*» имеет важное значение для развития фундаментальных и прикладных аспектов молекулярной биологии и отвечает всем требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Сюткин Алексей Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Заведующий лабораторией структурной биохимии белка
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимии им. А.Н.Баха Российской Академии наук
(119071, Россия, Москва, Ленинский проспект, д.33, строение 2
www.inbi.ras.ru тел. (495) 954-5283,
e-mail оппонента: levitsky@inbi.ras.ru)
доктор биологических наук, профессор

Дмитрий Иванович Левицкий

Подпись д.б.н., профессора Д.И. Левицкого завершено

Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института биохимии им. А.Н. Баха РАН
кандидат биологических наук



Александр Федорович Орловский

4 декабря 2014 г.

СВЕДЕНИЯ

об официальных оппонентах по кандидатской диссертации Сюткина Алексея Сергеевича на тему: «Изучение молекулярной организации жгутиков *Naoharsula marismortui*» по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология» (биологические науки)

Фамилия, Имя, Отчество	Гражданство	Место основной работы, должность	Ученая степень, звание	Шифр специальности и в совете	Основные научные труды (за последние 5 лет)
Левицкий Дмитрий Иванович	Российская Федерация	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, заведующий лабораторией структурной биохимии белка	доктор биологических наук, профессор	03.01.04 – Биохимия (биологические науки)	1. Pivovarova A.V., Khaitlina S.Yu. and Levitsky D.I. "Specific cleavage of the DNase-I binding loop dramatically decreases the thermal stability of actin", <i>FEBS Journal</i>, 2010, v. 277, № 18, p. 3812-3822. 2. Markov D.I., Zubov E.O., Nikolaeva O.P., Kurganov B.I., Levitsky D.I. «Thermal denaturation and aggregation of myosin subfragment I isoforms with different essential light chains». <i>International Journal of Molecular Sciences</i>, 2010, v. 11, № 11, p. 4194-4226. 3. Nevzorov I.A., Nikolaeva O.P., Kainov Y.A., Redwood C.S., Levitsky D.I. "Conserved non-canonical residue Gly-126 confers instability to the middle part of the tropomyosin molecule". <i>Journal of Biological Chemistry</i>, 2011, v. 286, No. 18, p. 15766-15772. 4. Невзоров И.А., Левицкий Д.И. «Тропомиозин: двойная спираль из мира белков». <i>Успехи биологической химии</i>, 2011, т. 51, с. 283-334. 5. Pivovarova A.V., Chebotareva N.A., Kremneva E.V., Lappalainen P., Levitsky D.I. "The effects of actin-binding proteins on the thermal stability of monomeric actin" <i>Biochemistry</i>, 2013, v. 52, № 1, p. 152-160.

					6. Matyushenko A.M., Artemova N.V., Shchepkin D.V., Kopylova G.V., Bershitsky S.Y., Tsaturyan A.K., Sluchanko N.N., Levitsky D.I. "Structural and functional effects of two stabilizing substitutions, D137L and G126R, in the middle part of α -tropomyosin molecule". <i>FEBS Journal</i> , 2014, v. 281, p. 2004–2016.
--	--	--	--	--	--

Заведующий лабораторией структурной биохимии белка
 Федерального государственного бюджетного учреждения науки
 Института биохимии им. А.Н.Баха Российской Академии наук
 (119071, Россия, Москва, Ленинский проспект, д.33, строение 2
www.inbi.ras.ru тел. (495) 954-5283,
 e-mail оппонента: levitsky@inbi.ras.ru)
 доктор биологических наук, профессор



Д.И. Левицкий

Подпись д.б.н., профессора Д.И. Левицкого заверяю.

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
 Института биохимии им. А.Н. Баха РАН,
 кандидат биологических наук



А.Ф. Орловский

2 декабря 2014 г.

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Сюткина Алексея Сергеевича

“Изучение молекулярной организации жгутиков *Haloarcula marismortui*”,

**представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.03 – молекулярная биология**

Диссертационная работа Сюткина Алексея Сергеевича посвящена исследованию внеклеточной части аппарата жгутиковой подвижности экстремального галофильного микроорганизма *Haloarcula marismortui*, относящегося к археям. Археи морфологически схожи с бактериями, однако на молекулярном уровне эти организмы имеют множество принципиальных отличий. Аппарат жгутиковой подвижности архей внешне напоминает бактериальный, однако отличается от него по целому ряду свойств. Возможно, что именно внешняя схожесть является причиной того, что жгутик архей до настоящего времени является малоизученной структурой, в то время как для жгутиков бактерий уже детально изучена структура и роль каждого из компонентов считается установленной. Изучение жгутиковой подвижности архей проводилось лишь на небольшом количестве модельных организмов, имеющих оперонную организацию генов основного структурного белка нити жгутика - флагеллина. С ростом числа архей, чьи геномы были секвенированы, стало ясно, что эти организмы имеют крайнее разнообразную организацию генов флагеллинов. Данное исследование позволило установить, что некоторые свойства, считавшиеся ранее характерными для архей, не являются таковыми, и связаны с малой выборкой проведенных ранее исследований.

Актуальность темы диссертации

Изучение механизмов формирования надмолекулярных структур и комплексов, к которым относятся жгутики, является важной проблемой современной биологической науки. Механизмы суперспирализации этих структур ранее были детально изучены лишь на примерах нитей жгутиков бактерий. Ряд проведенных в данном направлении работ позволил выдвинуть предположения относительно того, каким образом такие механизмы могут реализовываться у архей, однако эти работы не дали полного понимания проблемы. Для того, чтобы заполнить существующий пробел в понимании механизмов формирования и спирализации жгутиков архей, необходимы исследования более широкого круга их представителей.

Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы

На основании полученных в ходе работы результатов автором было сделано 6 выводов. Выводы, представленные в диссертационной работе Сюткина А.С., базируются на большом экспериментальном материале, обоснованы и полностью отражают результаты работы. Достоверность результатов и выводов диссертационной работы основаны на использовании проверенных и воспроизводимых методов и не вызывают сомнения. Новизна полученных результатов во многом обусловлена выбором объекта исследования, отличающегося от ранее исследованных организмов организацией генов аппарата подвижности, а также отсутствием у флагеллинов *H. marismortui* канонических сайтов для N-гликозилирования. В проведенной работе впервые было установлено, что наличие нескольких флагеллинов не является обязательным условием для формирования спирального филамента жгутика галофильных архей, как полагали ранее. Надо отметить, что достоверность данного результата была дополнительно подтверждена при исследовании еще одного представителя архей - *Halorubrum lacusprofundi*, который также был изучен в рамках данной работы. Кроме того, было показано, что флагеллины *H. marismortui* являются гликопротеинами с необычным типом гликозилирования, что, в свою очередь, расширяет наши знания о посттрансляционных модификациях белков у архей. Данный результат сам по себе является довольно важным и необычным, и автор не стал ограничиваться только окрашиванием с помощью реагента Шиффа, но и дополнительно подтвердил факт гликозилирования с помощью элементарного анализа. Третьим важным моментом работы является то, что из полученных результатов следует, что каждый из флагеллинов в отдельности способен формировать функциональную нить жгутика и это ставит вопрос о биологическом смысле избыточности по генам флагеллинов. Ряд проведенных экспериментов позволил установить, что данная избыточность является механизмом адаптации к изменениям условий окружающей среды, что является первым фактом такого рода в домене архей.

Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики

В диссертации впервые было показано, что спиральный и функциональный жгутик галофильных архей может строиться из субъединиц единственного белка. Таким образом, полученные результаты опровергли устоявшееся мнение, что множественность флагеллиновых генов у архей связана лишь с тем, что разные флагеллины могут выполнять функции разных конформационных состояний единственного бактериального

флагеллина, и что у архей возможна спирализация жгутика по "бактериальному" механизму.

Для практики данная работа может представлять интерес в связи с тем, что биологические полимеры используются в качестве матриц при создании материалов с заданными свойствами. Жгутики архей в этом плане обладают рядом преимуществ, в связи с их повышенной устойчивостью к различным воздействиям.

Содержание диссертации

Диссертационная работа Сюткина А.С. построена по традиционному плану, изложена на 122 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 147 наименований. В целом диссертация носит законченный характер, имеет достаточный объем иллюстрирующего материала, содержит 33 рисунка и 2 таблицы.

Во введении диссертации обосновывается актуальность задачи и ее научно-практическая значимость, а также сформулированы цели и задачи исследования. В разделе «обзор литературы» довольно подробно рассмотрены поверхностные структуры бактерий и архей, причем упор сделан на описании бактериальных жгутиков и пилей IV-го типа, а также аппарате жгутиковой подвижности архей. Перечисленные структуры достаточно подробно описаны и проиллюстрированы, что позволяет достаточно полно понять суть решаемой в работе проблемы. Раздел «обзор литературы» написан на основании как работ ставших уже классикой в своей области, так и самых последних статей, что позволяет судить о текущем состоянии дел. Данный раздел показывает, что автор в достаточной степени проработал литературу по теме.

Раздел «материалы и методы» содержит исчерпывающее описание использованных в ходе работы материалов и методов, что позволяет воспроизвести проведенные эксперименты другим исследователям.

Раздел «результаты и обсуждение» состоит из двух подразделов, первый из которых является основным и посвящен исследованию молекулярной организации жгутиков *H. marismortui*. На первом этапе автор демонстрирует способность данного организма к подвижности, при этом было обнаружено два штамма *H. marismortui*, продуцирующих жгутики различного белкового состава. Было показано, что, несмотря на то, что FlaB-филаменты строятся из единственного флагеллина, они спиральны и функциональны. Это показывает, что механизмы спирализации у галофильных архей более разнообразны, чем считалось ранее. Дальнейшее исследование филаментов позволило установить, что они

обладают рядом свойств, отличающих их от ранее исследованных жгутиков архей, а именно: бо́льшая толщина и наличие на кривых плавления нескольких пиков теплопоглощения. Отдельного упоминания заслуживает тот факт, что флагеллины *H. marismortui* являются гликопротеинами, несмотря на отсутствие канонических сайтов для N-гликозилирования; при этом данная посттрансляционная модификация является критически важной для функционирования аппарата подвижности. Дальнейшие эксперименты с использованием ограниченного протеолиза и анионнообменной хроматографии позволили установить, что субъединицы флагеллина в составе FlaB-жгутиков не идентичны, что, по мнению автора, может быть результатом различных конформационных состояний белка. Полученные результаты, в свою очередь, ставят вопрос о биологической целесообразности наличия двух генов флагеллинов в геноме данного организма, так как для нормальной подвижности достаточно лишь одного. Автор работы выдвигает гипотезу о том, что избыточность по генам флагеллинов является механизмом адаптации к меняющимся условиям окружающей среды, и таким образом, расширяет норму реакции данного организма. В серии проведенных экспериментов данная гипотеза нашла свое подтверждение, при этом проведенный теоретический анализ позволил выдвинуть предположение о том, какие именно отличия между флагеллинами позволяют им более успешно работать в тех или иных условиях. Второй подраздел, который можно охарактеризовать как дополнительный, посвящен изучению молекулярной организации жгутиков *Halorubrum lacusprofundi*. Геном данного микроорганизма содержит лишь один ген флагеллина, что не мешает ему формировать функциональные жгутики. Для флагеллина *H. lacusprofundi* также была продемонстрирована гетерогенность по зарядовым характеристикам. Полученный результат подтверждает данные по *H. marismortui*, свидетельствующие о том, что функциональный жгутик галофильных архей способен строиться лишь из единственного типа белка.

Диссертация Сюткина А.С. не лишена некоторых небольших недостатков, которые носят, в основном, технический характер. Так, например, слово «Архей» пишется то с прописной, то со строчной буквы, даже в пределах одного предложения – «...жгутики архей являются уникальной системой биологической подвижности, и в недавней работе было предложено называть жгутики Архей не жгутиками...» (стр.2 автореферата), имеются опечатки, которых, впрочем, не много, громоздкие предложения. Также надо отметить, что, хотя автор называет первой задачей своей работы «показать наличие жгутиковой подвижности у клеток *H. marismortui*», в выводах нет упоминания о том, что эта задача была решена (хотя это, конечно, было сделано в работе). Эти недостатки,

впрочем, не являются существенными и не снижают общего высокого уровня диссертационной работы.

Опубликование результатов диссертации в научной печати

Результаты и выводы диссертационной работы Сюткина А.С. в полном объеме представлены в печатных работах – 3-х статьях, опубликованных в международных и российском научных журналах. Материалы диссертации неоднократно представлялись на российских и международных конференциях.

Содержание автореферата

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

Заключение

Диссертационная работа Сюткина Алексея Сергеевича «Изучение молекулярной организации жгутиков *Haloarcula marismortui*» отвечает всем требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Сюткин Алексей Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Заведующий лабораторией инженерии белка
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова»
Российской академии наук (117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица
Миклухо-Маклая, дом 16/10)
www.ibch.ru, тел. +7 (495) 336-80-11,
доктор биологических наук, профессор  Долгих Д.А.
e-mail: dolgikh@nmr.ru

Подпись д.б.н., профессора Долгих Д.А. заверяю
Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова»
Российской академии наук
Доктор физико-математических наук  Олейников В.А.



СВЕДЕНИЯ

об официальном оппоненте по кандидатской диссертации Сюткина Алексея Сергеевича на тему: «Изучение молекулярной организации жгутиков *Nalaeis larimarum*» по специальности 03.01.03 - «молекулярная биология» (биологические науки)

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы, занимаемая должность	Ученая степень, звание	Шифр специальности	Основные работы
Долгих Дмитрий Александрович	Российская Федерация	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимической химии им. А.М.Пешкина и Ю.А.Овчинникова» Российской академии наук, заведующий лабораторией	доктор биологических наук, профессор	03.01.03 – молекулярная биология	1: Buechkov ML, Gasparian ME, Dolgikh DA, Kirichnikov MP. Combination of TRAIL with Bortezomib Shifted Apoptotic Signaling from DR4 to DR5 Death Receptor by Selective Internalization and Degradation of DR4. PLoS One. 2014 Oct. 13;9(10):e109756. PubMed PMID: 25310712 2: Petrovskaya LE, Novototskaya-Vlasova KA, Kryukova EA, Rivkina EM, Dolgikh DA, Kirichnikov MP. Cell surface display of cold-active esterase EstPc with the use of a new autotransporter from Psychrobacter cryohalolentis K5(T). Extremophiles. 2014 Sep 25. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25253411. 3: Amdurky N, Ferber D, Bortolotti CA, Dolgikh DA, Cherkova RV, Rechti I, Sheves M, Cahen D. Solid-state electron transport via cytochrome c depends on electronic coupling to electrodes and across the protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Apr 15;111(15):5556-61. PubMed PMID: 24706771; 4: Gasparian ME, Bobik TV, Kim YV,

					Ромопащенко НА, Долгих ДА, Габриов АГ, Кирпичников МР. Heterogeneous catalysis on the phage surface: Display of active human enteropeptidase. Biochimie. 2013 Nov;95(11):2076-81. PubMed PMID: 23917033. 5: Gushchin I, Chervakov P, Kuzmichev P, Popov AN, Round E, Borschchevskiy V, Ishchenko A, Petrovskaya L, Chupin V, Dolgikh DA, Arseniev AS, Kirpichnikov M, Gordeliy V. Structural insights into the proton pumping by unusual proteorhodopsin from nonmarine bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Jul 30;110(31):12631-6. PubMed PMID: 23872846.
--	--	--	--	--	---

Ученый секретарь ИБХ РАН

Олейников В.А.

