

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

БУРЕНИНОЙ Ольги Юрьевны

«Малые некодирующие 6S-1 и 6S-2 РНК из *Bacillus subtilis*: сравнительный анализ свойств и функций», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Сегодня общеизвестно, что среди клеточных РНК не более 2% собственно осуществляют кодирование белков, хотя длительное время эта функция считалась основным и чуть ли не единственным предназначением данного класса соединений. Информация о том, что роль РНК в жизнедеятельности организмов неизмеримо более обширна, возникла по меркам развития мировой науки очень недавно, в связи со всесторонним изучением геномов эукариот. Сейчас мы знаем о существовании как в бактериальных, так и в эукариотических клетках огромного количества разнообразных РНК, различающихся по размеру, функциям (в основном регуляторным) и по механизмам действия. Более того, значительная часть этих функций и тем более механизмов их осуществления для ряда конкретных РНК до сих пор остается неизвестной – присутствуют лишь эмпирические описания, да и то не всегда. В связи с этим тематика работы, связанная с изучением свойств конкретных представителей огромного семейства некодирующих РНК, оказывается своевременной и актуальной по определению.

Работа Бурениной О.Ю. посвящена детальному изучению свойств и функций двух малых некодирующих РНК из *Bacillus subtilis*, 6S-1 РНК и 6S-2 РНК, о которых до начала выполнения данной работы практически вообще ничего не было известно. РНК класса 6S из *E.coli* изучались хотя бы в течение 10-15 лет. Обнаружение же двух разновидностей РНК подобного типа в *Bacillus subtilis* (причем соотношение их в клетке изменяется в зависимости от стадии клеточного роста) это настолько «свежая» информация, что присутствие очень большого элемента новизны в данной работе просто неизбежно.

Для детального исследования необходимо было создать конструкцию, продуцирующую необходимые РНК в количествах, достаточных для их выделения и работы *in vitro*. Поэтому на основе вектора рUC18 были сконструированы соответствующие плазмиды, которые использовались в качестве транскрипционных матриц. Отметим, что выделение гомогенной РНК всегда сопряжено с большими трудностями в силу лабильности продукта и повсеместного существования весьма

стабильных и «вездесущих» РНКаз. Поэтому пришлось дополнить стандартный протокол очистки выделением целевого продукта из геля.

Вторым необходимым компонентом для проведения исследования являлась РНК-полимераза (РНКП) из *Bacillus subtilis*, которая была также собственноручно выделена диссертантом. При этом использовались три методики, две из которых были описаны в литературе, а третья создана автором (в сотрудничестве с зарубежной лабораторией). Именно эта третья, оригинальная, методика и позволила получить фермент со степенью очистки, необходимой для экспериментов по взаимодействию РНКП с 6S РНК.

Вооружившись специально созданными исходными компонентами, автор приступила к детальному исследованию взаимодействия РНКП с малыми РНК 6S-1 и 6S-2. Было изучено комплексообразование фермента с РНК и впервые определены константы диссоциации полученных комплексов (оказавшиеся близкими для 6S-1 и 6S-2 РНК).

Зная, что основная роль 6S-РНК из *E.coli* заключается в ингибировании транскрипции за счет конкуренции с промоторами, было необходимо выяснить, обладают ли таким свойством 6S-РНК из *Bacillus subtilis*. Для этого были выбраны два промотора генов, один из которых кодировал рРНК, а второй – белок с неизвестной функцией. Промоторы различались также стартовым нуклеотидом (dG и dA, соответственно). Был показан заметный эффект ингибирования транскрипции в обоих случаях.

Поскольку при предварительном исследовании на двух случайно выбранных промоторах оказалось, что на одном из них влияние 6S-1 и 6S-2 было схожим, а на другом заметно различалось – далее был исследован еще целый ряд промоторов с различными последовательностями промоторных элементов. Представлена обширная панель результатов, и установлено, что результаты не коррелируют с промоторной последовательностью, а наличие разницы между влиянием 6S-1 и 6S-2 проявляется на некоторых, но не на всех объектах. К сожалению, никакой закономерности, позволяющей сделать однозначные выводы, обнаружить не удалось.

Особенно интересной частью работы является исследование роли пРНК, синтезируемых на матрицах 6S-РНК. Было впервые показано, что эти продукты синтезируются *in vitro*, причем их преобладающая длина оказалась различной в случае 6S-1 и 6S-2 РНК. Особенно оригинальным и остроумным выглядит метод, позволивший определить, с какой именно точки РНК осуществляется синтез пРНК. Автор использовал различные меченые нуклеозидтрифосфаты и определял позицию их включения в цепь пРНК. Далее исследовали функциональность комплексов каждой из 6S РНК с

соответствующими пРНК в зависимости от их длины. Оказалось, что в случае 6S-1 РНК длина преобладающего транскрипта фактически совпадала с оптимальной длиной, необходимой для образования стабильного комплекса и блокирования доступа РНКП. В то же время для 6S-2 РНК стабильный комплекс достигался лишь при длине транскрипта 20 нуклеотидных остатков, тогда как преобладающие транскрипты имели длину не более 16 нуклеотидных остатков, хотя при повышении концентрации АТР возможен синтез более длинных фрагментов. Это открытие позволяет рассмотреть еще один аспект регуляторного механизма действия этих РНК, а именно его зависимость от концентрации (возможно, локальной концентрации *in vivo*) АТР.

Для более подробного изучения были получены синтетические пРНК, сформированы соответствующие комплексы, и изучено влияние уже этих «готовых» комплексов на РНКП. Данный подход подтвердил ранее сделанные наблюдения – длины стабильных дуплексов 6S-1 и 6S-2 различны, и только стабильные дуплексы функциональны в плане регуляции активности РНКП.

Несколько менее однозначной, хотя и не менее интересной, является заключительная часть работы, содержащая исследования *in vivo*. (Заметим в скобках, что сам термин *in vivo* в применении к исследованию на клеточных линиях не совсем корректен, чаще под исследованиями *in vivo* понимается целый организм (животное). В данном случае более адекватен термин «исследование на клетках»). К сожалению, сравнительно небольшой срок, в течение которого в мире проводятся подобные исследования, неизбежно имеет следствием существование огромного количества неизвестных и непонятных фактов. И количество этих фактов мало уменьшилось после проведения данного исследования. Хотя в результате получена обширная информация – она с трудом поддается систематизации, полученные результаты представляются эмпирическими, и не могут дать ответы на вопрос о каких-то конкретных механизмах. Тем не менее, сама по себе такая работа представляется очень полезной, потому что каждый последующий исследователь имеет возможность пользоваться этими сведениями, изучая в каждом конкретном случае отдельный промотор или отдельный белок. В дальнейших исследованиях уже можно будет учесть, что на той или иной стадии клеточного роста та или иная 6S РНК влияет на уровень транскрипции (или на содержание определенного клеточного белка) тем или иным образом. В определенном смысле это исследование представляет собой основу для будущих экспериментов.

Характеризуя работу в целом, можно отметить весьма грамотную последовательность построения работы, логичные переходы от детальных механизмов *in*

in vitro к более общим сведениям *in vivo*. Следует еще раз акцентировать незаурядно большую степень новизны представленных результатов. Несмотря на то, что отчасти это объективное следствие выбора «свежей» темы – нельзя не отметить и заслуги собственно диссертанта.

Из недостатков работы традиционно можно указать ряд опечаток (их мало) и неудачных выражений, которых не лишена ни одна диссертационная работа. Помимо этого представляется возможным указать на одно небольшое упущение. При подробной характеристике РНКП не были определены константы Михаэлиса (K_M) для включения каждого из рибонуклеотидов в синтезирующуюся цепь РНК на матрице ДНК и пРНК на матрице 6S РНК. Хотя фермент, осуществляющий синтез традиционных транскриптов и пРНК в данном случае один и тот же (РНКП из *Bacillus subtilis*), это не означает, что K_M процесса включения всех нуклеозидтрифосфатов в обоих процессах будет одинаковой. Известно, что для многих РНК-полимераз K_M встраивания инициаторного нуклеотида существенно выше, чем для тех нуклеозидтрифосфатов, которые используются только на стадии элонгации. Более того, даже усредненная K_M , будучи измеренной в синтезе коротких транскриптов, оказывается завышенной по сравнению с длинными последовательностями. Еще большее влияние на K_M может оказать характер матрицы, а в данном случае одним и тем же ферментом синтезируются традиционные транскрипты с ДНК матрицы, и пРНК с РНК-матрицы. Не зная, каков порядок величин K_M для синтеза транскриптов данной РНК-полимеразой, сложно исследовать и обсуждать зависимость различных параметров от концентрации нуклеозидтрифосфатов, и тем более делать предположения о механизмах этих процессов. Так, на стр. 77 обсуждаются причины увеличения эффективности ингибирования транскрипции в присутствии 6S РНК при уменьшении концентрации нуклеозидтрифосфатов, и делается обоснованное предположение о конкурентных (за нуклеозидтрифосфаты) процессах транскрипции на матрице, и транскрипции пРНК с 6S РНК. Эта гипотеза могла бы быть более убедительной, если бы были известны K_M встраивания нуклеотидов в каждом случае.

В целом, автором проделана очень большая и трудоемкая работа, позволившая получить большое количество действительно новой, оригинальной и актуальной информации. Начав с исследований *in vitro*, автор логично переходит в своем исследовании на клеточный уровень, что демонстрирует уверенное владение как теорией, так и методологией в весьма обширной области.

Обзор литературы посвящен некодирующим РНК, обширен и фактически исчерпывающ. Помимо обсуждения различных классов некодирующих РНК,

рассматриваются детали функционирования множества их конкретных представителей. Поиск этой конкретики в море соответствующей литературы сам по себе является нетривиальной задачей.

Выводы работы в целом соответствуют результатам, автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации. Таким образом, диссертационная работа Бурениной О.Ю. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, изложенным в пункте 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. В ней содержится решение задачи установления свойств и функций новых некодирующих РНК, являющихся ингибиторами транскрипции, имеющей значение для развития биоорганической химии. В связи с этим считаю, что Буренина О.Ю. безусловно заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Доктор химических наук,
ведущий научный сотрудник Лаборатории
молекулярных основ действия физиологически
активных соединений Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта РАН



Туницкая В.Л.

02.06.2014

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32
тел.: +7(499)135-05-90, e-mail: ve_tun@mail.ru

