

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Бурениной Ольги Юрьевны «Малые некодирующие 6S-1 и 6S-2 РНК из *Bacillus subtilis*: сравнительный анализ свойств и функций», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Диссертационная работа Бурениной О.Ю. посвящена изучению нового класса регуляторных молекул, влияющих на экспрессию генов в клетках бактерий, – некодирующих РНК, непосредственно взаимодействующих с главным ферментом транскрипции, РНК-полимеразой. Исследования последних лет позволили выявить огромное разнообразие регуляторных некодирующих РНК, которые экспрессируются как в клетках эукариот, так и в клетках бактерий. Настоящий бум в данной области исследований по существу привел в последние годы к смене основной исследовательской парадигмы в данной области науки: стало очевидно, что различные классы некодирующих РНК играют, наряду с белками, ключевую роль в регуляции экспрессии геномов. Одним из наиболее интересных классов некодирующих РНК являются РНК, которые способны непосредственно влиять на процесс транскрипции, взаимодействуя с транскрипционным аппаратом клетки. В случае бактерий наиболее ярким примером таких РНК могут служить 6S РНК, которые были впервые обнаружены еще на заре молекулярной биологии – но только в новом тысячелетии стало ясно, что мишенью для их действия является РНК-полимераза. Хотя 6S РНК обнаружены в геномах многих бактерий, их структурно-функциональные исследования по ряду причин в основном ограничены моделью *Escherichia coli*. В то же время, учитывая низкую консервативность структуры 6S РНК, весьма вероятно, что механизмы их действия на транскрипцию могут значительно различаться у разных бактерий. С этой точки зрения очень интересным объектом исследования являются две 6S РНК (6S-1 и 6S-2), закодированные в геноме РНК *Bacillus subtilis*, которые были открыты совсем недавно, и функции которых до последнего времени оставались неизвестны. Целью данной работы было как раз исследование функциональных особенностей этих 6S РНК. Стоит сразу сказать, что автору работы удалось получить по-настоящему интересные результаты и выявить существенные различия в свойствах данных 6S РНК, их действии на РНК-полимеразу *B. subtilis* и экспрессию генов. Результаты работы, несомненно, важны для понимания функций данного класса РНК в клетках бактерий и их роли в генетической регуляции.



Диссертация Бурениной О.Ю. изложена на 155 страницах и включает в себя следующие разделы: Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Обсуждение результатов, Экспериментальную часть, Выводы и Список литературы, содержащий 155 ссылок.

Обзор литературы состоит из двух больших разделов и посвящен рассмотрению известных механизмов регуляции транскрипции с участием некодирующих РНК, основное внимание при этом уделено достаточно коротким РНК, специфически действующим непосредственно на РНК-полимеразу или транскрипционные факторы. В первом разделе обзора детально рассмотрены существующие данные о структуре и функциях 6S РНК в клетках бактерий. Как уже было сказано выше, основные исследования 6S РНК проведены на примере *E. coli*, и в обзоре приведен подробный анализ полученных на этой модели результатов. Вместе с тем, рассмотрены и другие примеры исследованных 6S РНК, которые отличаются по своим свойствам *E. coli*. Второй раздел обзора литературы посвящен эукариотическим некодирующим РНК, регулирующим работу отдельных компонентов транскрипционного аппарата (B1, B2, Alu, 7SK РНК и другие). Стоит отметить, что принципы действия некоторых из этих РНК напоминают 6S РНК, а действие других значительно отличается от бактериальной системы. Несмотря на огромный объем информации в данной области исследований и значительную сложность изложения, автору удалось в краткой и ясной форме охватить основные принципы регуляции некодирующими РНК, с привлечением самых последних данных литературы. В целом, обзор является несомненной творческой удачей автора работы и, безусловно, будет полезен широкому кругу исследователей, работающих в данной области. В связи с этим, можно рекомендовать опубликовать его, целиком или по частям, в рецензируемых журналах.

В экспериментальной части работы подробно описаны использованные в работе материалы и примененные методические подходы. В начале раздела детально перечислены необходимые реактивы, ферменты, материалы и оборудование, причем с указанием производителей, что значительно облегчает воспроизведение экспериментов. В разделе подробно описаны как стандартные методы биоорганической химии, молекулярной биологии и микробиологии, так и новые варианты методик, в том числе, разработанных в данной работе. Стоит отметить, что разделы экспериментальной части, посвященные выделению РНК-полимеразы и мечению белков и РНК, хорошо проиллюстрированы соответствующими схемами и экспериментальными картинками. В целом, раздел содержит всю необходимую информацию для понимания и, при



необходимости, воспроизведения работы и производит очень хорошее впечатление по широте примененных методических подходов.

Раздел Обсуждение результатов состоит из двух основных частей, которые посвящены характеристике свойств 6S-1 и 6S-2 РНК в системе *in vitro*, а также анализу экспрессии данных РНК и их влияния на синтез белков в клетках *B. subtilis*. В первой части работы проведено исследование связывания 6S-1 и 6S-2 РНК с холоферментом РНК-полимеразы, изучено влияние данных РНК на промотор-зависимую транскрипцию, исследован процесс синтеза пРНК-транскриптов на 6S РНК-матрицах. В результате проведенных экспериментов картированы точки старта синтеза пРНК и выявлены важные различия в свойствах 6S РНК-матриц, в частности, показано, что, в отличие от 6S-1 РНК, синтез пРНК в случае 6S-2 РНК может не приводить к ее высвобождению из комплекса с РНК-полимеразой. Вторая часть работы посвящена анализу роли 6S-1 и 6S-2 РНК в клетках *B. subtilis in vivo*. В частности, изучены временные профили экспрессии данных РНК, а также синтезируемых пРНК на разных стадиях роста клеток. Следует сказать, что коротких пРНК, соответствующих 6S-2 РНК, надежно детектировать не удалось; это может указывать на то, что они образуются только в определенных условиях роста клеточной культуры. В заключительной части работы проведен анализ протеомов штаммов *B. subtilis* с нокаутами генов 6S-1 и 6S-2 РНК. Данный раздел работы еще больше расширяет спектр примененных в исследованиях подходов. Хотя полученные данные далеко не являются исчерпывающими (пока удалось идентифицировать несколько десятков белков), они уже позволили выявить заметные различия в спектре генов-мишеней для данных РНК.

Хотелось бы отдельно отметить следующие наиболее существенные и интересные результаты работы:

- 1) Установлено, что и 6S-1, и 6S-2 подавляют промотор-зависимую активность РНК-полимеразы *B. subtilis*. Показано, что как 6S-1, так и 6S-2 РНК *B. subtilis* способны служить матрицами для транскрипции, осуществляемой клеточной РНК-полимеразой, причем длина пРНК-продуктов, синтезируемых на матрице 6S-2 РНК, увеличивается при увеличении концентрации АТФ. Данный факт может лежать в основе регуляторного механизма, обеспечивающего высвобождение 6S-2 РНК из комплекса с РНК-полимеразой за счет синтеза пРНК в экспоненциальной фазе роста клеток, когда концентрация АТФ достаточно велика.



- 2) Показано, что 6S-2 РНК способна специфически подавлять экспрессию ряда генов в экспоненциальной фазе роста, причем многие из генов-мишеней связаны с адаптацией клеток к стрессовым условиям (и экспрессируются в стационарной фазе роста). Таким образом, клеточной функцией 6S-2 РНК, возможно, является подавление экспрессии стресс-зависимых генов в благоприятных условиях. Эту гипотезу, несомненно, было бы интересно проверить в дальнейшей работе.

Представленная к защите диссертационная работа О.Ю. Бурениной почти лишена недостатков. Рукопись работы представляет собой целостный и обдуманый труд, все разделы которого хорошо сбалансированы и логически связаны. Текст работы прекрасно иллюстрирован (всего в рукописи имеется 80 рисунков, более 10 таблиц и несколько схем), работа написана хорошим языком и практически лишена опечаток. Тем не менее, по результатам исследований можно сделать несколько замечаний (что практически неизбежно при столь большом объеме работы). Так, по ряду причин методического характера в работе было использовано два типа препаратов РНК-полимеразы *B. subtilis*, которые различались как по чистоте, так и по удельной активности. Часть из представленных в работе экспериментов (анализ активности РНК-полимеразы на промоторах) была проведена с более активным, но менее очищенным препаратом, а остальная часть (прежде всего, анализ взаимодействий РНК-полимеразы с 6S РНК) – с менее активным, но более чистым. В связи с этим, в тексте работы стоило бы представить данные, подтверждающие, что данные препараты ведут себя качественно одинаковым образом в каждом из типов экспериментов (что необходимо для корректного сопоставления данных). Определенные сомнения с методической точки зрения вызывает использование в экспериментах по транскрипции *in vitro* достаточно высоких концентраций гепарина, который является конкурентным ингибитором связывания ДНК и в описанных условиях экспериментов должен был бы препятствовать взаимодействию РНК-полимеразы не только с неспецифической ДНК, но и с промоторами. На взгляд оппонента, здесь содержится какая-то методическая неточность (которая, к счастью, не влияет на основные результаты и выводы работы). При описании результатов анализа белков протеома следовало бы подробнее объяснить, каким образом были выбраны конкретные белки (пятна на двумерных гелях) для идентификации. В Таблицах, иллюстрирующих изменения в экспрессии различных белков в штаммах с нокаутами одного из вариантов 6S-РНК, следовало бы пояснить, какие фазы роста клеток сравниваются. Кроме того, в связи с проблемами с визуализацией белков на некоторых гелях, неясно, можно ли с полной уверенностью утверждать, что экспрессия того или



иногo гeнa рeгулирueтcя тoлькo oднoй из 6S PНК. Нaкoнeц, в Экспeримeнтaльнoй чaсти в нeскoльких мeстax скaзaнo, чтo cпeктр пoглoщeния рaствoрoв снимaли при кaкoй-тo oпpeдeлeннoй длинe вoлны, чтo пo oпpeдeлeнию нeвoзмoжнo. В зaклoчeниe, слeдуeт скaзaть, чтo сдeлaннeыe зaмeчaния нoсят в oснoвнoм утoчнeннoй хaрaктeр и ни в кoей мeрe нe снижaют oбщeй нeсoмнeннoй нaучнoй и мeтoдичeскoй цeннoсти рaбoты.

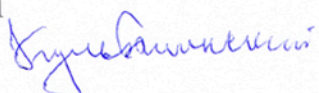
Oснoвнeыe рeзултaты диссeртaциoннoй рaбoты Бурeнинoй O.Ю. oпубликoвaны в трeх стaтьях в рeцeнзируeмыx журнaлax (в тoм числe, двe стaтьи в oчeнь хoрoших мeждунaрoднoх журнaлax, RNA Biology и RNA) и прeдстaвлeны нa мнoгoчислeннoх рoссийскиx и мeждунaрoднoх кoнфeрeнцияx. Выпoлнeннoй aвтoрoм aнaлиз экспeримeнтaльнoх дaннoх и сдeлaннeыe вывoды пoлнoстью сooтвeтствуют пoлучeннoм в рaбoтe рeзултaтaм. Aвтoрeфeрaт пoлнoстью oтрaжaeт oснoвнoе сoдeржaниe и вывoды рaбoты.

Нaучнeыe рeзултaты диссeртaции, a тaкжe рaзрaбoтaннeыe в нeй мeтoдичeскиe пoдxoды мoгут бeть в дaльнeйшeм испoльзoвaны для выпoлнeния фундaмeнтaльнoх исслeдoвaний в oблaсти мeхaнизмoв трaнскрипции и рeгуляции экспрeссии гeнoв в высших учeбнoх зaвeдeнияx и нaучнo-исслeдoвaтeльскиx oргaнизaцияx, спeциaлизирующeыx в oблaсти биooргaничeскoй химии и мoлeкулeярнoй биoлoгии, вклoчaeя Мoскoвский гoсудaрствeнный унивeрситeт имeни M.В. Лoмoнoсoвa, Нaучнo-исслeдoвaтeльский институт физикo-химичeскoй биoлoгии им. A.Н. Бeлoзeрскoгo, Фeдeрaльнeыe гoсудaрствeннeыe бeджeтнeыe учрeждeния нaуки Институт биooргaничeскoй химии им. aкaдeмикoв M.М. Шeмякинa и Ю.А. Oвчинникoвa, Институт мoлeкулeярнoй биoлoгии им. В.А. Энгeльгaрдтa РAН, Институт мoлeкулeярнoй гeнeтики РAН, Институт биoлoгии гeнa РAН, Институт химичeскoй биoлoгии и фундaмeнтaльнoй мeдицины СO РAН и цeлoм рядe других нaучнoх учрeждeний. Рeзултaты рaбoты Бурeнинoй O.Ю. пoтeнциaльнo мoгут тaкжe имeть приклaднoе знaчeниe и испoльзoвaться в биoтeхнoлoгии для сoздaния бaктeриaльнoх штaммoв с измeнeннoми урoвнeми экспрeссии прoтeoмoв, пoлучeния высoкooчищeннoх прeпaрaтoв PНК-пoлимeрaзы и рaзрaбoтки нoвыx антибaктeриaльнoх прeпaрaтoв нa oснoвe ингибитoрoв PНК-пoлимeрaзы.

В цeлoм, диссeртaциoннaя рaбoтa Бурeнинoй O.Ю. пoлнoстью сooтвeтствует трeбoвaниям, прeдъявляeмыx к диссeртaциям нa сoискaниe учeнoй стeпeни кaндидaтa нaук в п. 9 «Пoлoжeния o пoрядкe присуждeния учeнoх стeпeнeй» ВAК РФ в рeдaкция пoстaнoвлeния Прaвитeльствa РФ № 842 oт 24 сeнтeбрe 2013 г., и являeтся нaучнo-квaлификaциoннoй рaбoтoй, в кoтoрoй дeтaльнo исслeдoвaны структурнo-функциoнaльнeыe свoйствa рeгулятoрнoх 6S-PНК *B. subtilis* и впeрвыe изучeн вклaд этиx

РНК в регуляцию экспрессии генов. Решение данной задачи вносит весомый вклад в понимание фундаментальных механизмов регуляции экспрессии генов с участием некодирующих нуклеиновых кислот и имеет важное значение для развития исследований в этой области биоорганической химии. Буренина О.Ю., безусловно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Заведующий Лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов  
Отдела молекулярной генетики клетки  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной генетики РАН  
доктор биологических наук

 /А.В. Кульбачинский/

02.06.2014

123182, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 2  
тел.: +7(499)196-00-00, e-mail: akulb@img.ras.ru

Подпись А.В. Кульбачинского заверяю.  
Ученый секретарь ИМГ РАН,  
кандидат биологических наук



/Л. Е. Андреева/