



ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
**ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ**
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИХБФМ СО РАН)

Просп. ак. Лаврентьева, 8, г. Новосибирск, 630090
тел. (383) 363-51-50, факс. (383) 363-51-53
E-mail: niboch@niboch.nsc.ru, <http://www.niboch.nsc.ru>

02.06.2014 на №15309-8611-22

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор ФГБУН Института химической
биологии и фундаментальной медицины СО РАН
Академик В.В. Власов



“2” июня 2014 г.

О Т З Ы В

ведущей организации – ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН – 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 ученой степени кандидата химических наук по
специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

В последние годы был сделан ряд открытий, которые радикально изменили представления о механизмах функционирования генетических систем. Было обнаружено, что большая часть генома является транскрипционно активной, при этом согласно некоторым данным до 97% транскриптов не связаны с кодированием белковых последовательностей. Оказалось, что эти транскрипты (некодирующие РНК) играют определяющую роль на всех этапах реализации генетической информации. Разнообразные по размерам, структуре и функциям некодирующие РНК регулируют экспрессию генов на разных уровнях от ремоделирования хроматина до подавления трансляции. В геноме человека найдено более 1000 последовательностей, способных кодировать миРНК, которые могут влиять на 60% экспрессируемых генов. Предполагают, что в эукариотической клетке могут функционировать также тысячи различных длинных некодирующих РНК, участвующих в регуляции. Однако достоверные данные относительно активности конкретных последовательностей имеются пока лишь для немногим более ста из них. Многие некодирующие РНК имеют собственные гены, другие образуются в результате транскрипции интронных последовательностей или считываются с некодирующей цепи ДНК.

Аналогичные или близкие механизмы регуляции были обнаружены и для прокариот, причем некоторые из таких регуляторных РНК были найдены достаточно

давно, хотя их функция была неизвестна. Неожиданным стало открытие в прокариотах малых некодирующих 6S РНК, подавляющих транскрипцию за счет непосредственного связывания с холоферментом РНК-полимеразы и блокирования ее активного центра. Аналоги бактериальных 6S РНК были найдены и в клетках высших эукариот, в том числе и у человека – это Alu РНК, 7SK U1 мРНК, что показывает общность механизмов регуляции экспрессии генов под действием некодирующих РНК.

Диссертационная работа Бурениной О.Ю. направлена на изучение двух некодирующих РНК из грамположительной бактерии *Bacillus subtilis*, а именно 6S-1 и 6S-2 РНК, из которых 6S-1 РНК экспрессируется в клетках, главным образом, в стационарной фазе роста клеток, а 6S-2 РНК – в экспоненциальной фазе. К моменту начала работы причины появления дополнительной 6S-2 РНК в условиях активного роста клеток, а также ее свойства и функции были неизвестны. В результате проведенных исследований Буренина О.Ю. впервые продемонстрировала, что 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* способны подавлять транскрипцию генов благодаря взаимодействию с РНК-полимеразой, а также, что эти РНК могут служить матрицей для синтеза коротких, комплементарных им фрагментов РНК длиной 10-20 нуклеотидных звеньев. Кроме того, в работе показано, что экспрессия многих белков регулируется 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis*, что свидетельствует о важной функциональной роли этих молекул в жизнедеятельности клеток. Исследования в данной области относятся к приоритетному направлению развития научно-технологического комплекса России «Живые системы», а также к критическим технологиям «Геномные и постгеномные технологии создания лекарственных препаратов», поэтому актуальность представленной работы не вызывает сомнений.

Работа изложена на 155 страницах, содержит 14 таблиц, 80 рисунков и 3 схемы, список литературы включает 155 цитированных работ. Основные результаты работы представлены и апробированы на 8 научных конференциях и форумах и опубликованы в виде 3 статей в рецензируемых журналах. Автореферат включает основные положения, выносимые на защиту.

Диссертация Бурениной О.Ю. построена традиционным образом и состоит из введения, обзора литературы, изложения результатов и их обсуждения, описания материалов и методов исследования, выводов и списка цитированной литературы.

Во введении описана фундаментальная проблема, которой посвящена диссертационная работа, обоснованы актуальность и новизна исследований, сформулированы цель работы и решаемые задачи.

В обзоре литературы «Механизмы регуляции транскрипции посредством некодирующих РНК в прокариотах и эукариотах» суммированы данные о функциях некодирующих РНК, подавляющих транскрипцию путем непосредственного взаимодействия с РНК-полимеразой: это такие РНК как 6S *E. coli*, и аналоги 6S РНК из

других бактерий. Также рассмотрены РНК, кодируемые SINE-элементами, и РНК эукариот, взаимодействующие с транскрипционными факторами. Очень хорошо, что автор рассматривает проблему ретроспективно, показывая, как менялись наши представления о роли некодирующих РНК. Обзор литературы написан грамотно, изложен в классическом академическом стиле и хорошо иллюстрирован, что значительно облегчает восприятие рассмотренных автором вопросов. Особенно хочется отметить важность собранного и систематизированного диссертантом материала о некодирующих РНК про- и эукариот, ингибирующих транскрипцию путем связывания с РНК-полимеразой. Интересно, что некоторые из этих РНК были обнаружены достаточно давно, однако их функция оставалась неизвестной. Ввиду того, что данные, приведенные в обзоре, хорошо систематизированы и изложены, рекомендую Бурениной О.Ю. опубликовать этот материал в виде отдельного обзора в научном журнале для ознакомления с данной темой более широкой аудитории специалистов.

В Главе II приведены результаты сравнительного анализа свойств и функций некодирующих 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis*. Буренина О.Ю. начинает свою работу с постановки методов получения этих некодирующих РНК *in vitro* и с отработки метода выделения РНК-полимеразы, причем автор работы четко представляет себе, какова должна быть чистота препарата фермента, необходимая ей для дальнейшей работы. Собственно сравнительный анализ свойств некодирующих РНК – структурных аналогов 6S РНК *E. coli*, состоит из следующих этапов: 1) анализ связывания этих РНК с РНК-полимеразой; 2) изучение конкуренции между некодирующими РНК и различными промоторами в условиях транскрипции *in vitro*; 3) изучение особенностей взаимодействия фермента с 6S-1 и 6S-2 РНК в плане синтеза коротких пРНК и 4) изучение роли 6S-1 и 6S-2 РНК *in vivo*. В частности, автором впервые показано, что 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* способны специфически ингибировать *in vitro* транскрипцию модельных промоторов различных генов; впервые в условиях *in vitro* показан синтез РНК-полимеразой коротких транскриптов на матрице 6S-1 и 6S-2 РНК и определены последовательности образующихся продуктов. Бурениной О.Ю. установлено, что длина образующихся транскриптов играет ключевую роль в формировании дуплекса с 6S РНК и блокировании взаимодействия 6S РНК с РНК-полимеразой. Кроме того, длина транскриптов может зависеть от конкретных условий. Автором идентифицирован ряд белков *B. subtilis*, экспрессия которых подавляется в присутствии обеих 6S РНК. Следует отметить системный подход, использованный диссертантом и позволивший получить данные о свойствах и функциях некодирующих 6S РНК *B. subtilis*, которые существенно расширяют имеющиеся знания о механизмах регуляции транскрипции.

Глава III содержит подробное и исчерпывающее описание использованных методов и подходов. Приведенные в ней экспериментальные протоколы описаны детально, так что могут стать настольным пособием для любого желающего, который захочет применить их в своих исследованиях. Это является несомненным достоинством

работы. Обилие использованных в работе методических подходов от оптимизации методики выделения РНК-полимеразы, клонирования и получения РНК с помощью транскрипции *in vitro* до анализа протеома нокаутных по некодирующим РНК штаммов *B. subtilis* – все это позволяет говорить о высоком методическом уровне работы и высокой квалификации соискателя.

Работа представляет собой систематическое, вполне законченное исследование, выполненное автором в коллективе с различными специалистами. Материал диссертации изложен последовательно, ясно и логично. Использованные в работе экспериментальные методы обоснованы и приняты в практике научных исследований. Результаты опытов достоверны, научные положения и сформулированные выводы, изложенные в диссертации, вытекают из экспериментальных данных. В рамках общих требований к оформлению диссертации приятно отметить, что диссертация написана грамотным научным языком, хорошо оформлена и практически не имеет опечаток или неудачных выражений.

По представленной диссертационной работе необходимо сделать следующие замечания. 1) В работе используется нумерация рисунков и таблиц по главам, что загромождает текст и затрудняет чтение, например (рис. II.34Б,В, дорожка z). Несомненно, при написании работы такая нумерация иллюстративного материала по главам очень удобна, но при чтении – нет. 2) Подписи к рисункам II.22, II.25-27 чрезвычайно громоздки, длинные (12-23 строки) изобилующие аббревиатурами и обозначениями использованных синтетических олигонуклеотидов, выполненными в черном и сером цветах. Данные, приведенные на этих рисунках, можно было бы привести, например, в виде гистограмм. 3) Есть неудачные выражения, например «стр. 41, 2-ой абзац: «В геноме человека содержится более миллиона копий Alu-последовательностей, кодирующих Alu РНК», или в подписи в рис. I.37 присутствуют лишние, не убранные при редактировании слова. Нельзя признать удачной многократную ссылку в тексте на «оптимизированную методику блот-гибридизации в варианте Нозерн с применением комплементарных к РНК-мишени зондов смешанной природы – олигодезоксирибонуклеотидов с включением остатков ковалентно замкнутых нуклеозидов (см. раздел II.5)», что в более простом варианте означает использование зондов, содержащих LNA-нуклеозиды, структуры которых приведены на рис. II.18 и в таблице III.9.4.

Перечисленные замечания не являются принципиальными, носят скорее рекомендательный характер и не ставят под сомнение основные результаты, фундаментальную и практическую значимость работы.

Содержание материалов диссертационной работы достаточно полно отражено в публикациях Бурениной О.Ю. Выводы обоснованы и хорошо проиллюстрированы материалами автореферата. Автореферат отражает основное содержание диссертации. В целом, диссертационная работа Бурениной О.Ю. представляет собой научно-

квалификационную работу, в которой содержится решение важной фундаментальной задачи, связанной с функционированием некодирующих 6S-1 и 6S-2 РНК *B. subtilis* и их роли в регуляции транскрипции. Полученные данные представляют интерес для исследований, связанных с регуляцией экспрессии генов, выяснением функций некодирующих РНК, а также изучением механизмов регуляции транскрипции про- и эукариот, которые проводятся в институтах академического профиля – Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки: Институте молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Институте биохимии имени А.Н. Баха, Институте белка РАН, Институте биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институте цитологии и генетики СО РАН и др.), а также для биомедицинских исследований, направленных, например, на поиск и разработку новых антибактериальных средств. Представленная работа полностью соответствует предъявляемым к кандидатским диссертациям требованиям, изложенным в п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. А именно, в диссертации впервые продемонстрированы свойства новых некодирующих РНК – регуляторов транскрипции, и получены важные результаты, необходимые для развития современной биоорганической химии. Автор диссертационной работы Буренина Ольга Юрьевна несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Отзыв на диссертационную работу Бурениной Ольги Юрьевны заслушан и утвержден на семинаре Лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН 30 мая 2014 г., протокол №4.

Зав. лабораторией биохимии нуклеиновых кислот
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института химической биологии и
фундаментальной медицины
Сибирского отделения РАН,
д.б.н., профессор

М.А. Зенкова

Подпись М.А. Зенковой удостоверяю

Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института химической биологии и
фундаментальной медицины
Сибирского отделения РАН, к.б.н.



М.Р. Кабилов