

Отзыв официального оппонента на диссертационную работу

Якуниной Марии Вячеславовны

«Функциональная активность и биохимические свойства невирионной многосубъединичной РНК-Полимеразы бактериофага phiKZ»

представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук
(специальность 03.01.03 – Молекулярная биология)

Актуальность и новизна диссертационного исследования

Вирусы бактерий, бактериофаги, широко распространены на земле и их количество, как минимум, на порядок превышает численность бактерий. Из всего этого многообразия вирусов представители группы гигантских бактериофагов, кодирующих две многосубъединичные РНК полимеразы (мсРНКП), заслуживают особого внимания, поскольку они инфицируют широкий спектр бактерий, в том числе клинически важные патогены *Pseudomonas*, *Yersinia* и *Salmonella*. Эти бактерии часто поражают больных с муковисцидозом, а также с другими заболеваниями, сопряженными с иммунодефицитом, и являются прототипами антибиотико-устойчивых организмов, плохо поддающихся лечению стандартными антибиотиками. Фаги группы phiKZ рассматриваются как возможные компоненты фаговых коктейлей для лечения таких бактериальных инфекций, а также как источник специализированных фаговых белков, осуществляющих ингибирование роста и лизис бактериальной клетки. Соответственно, изучение механизмов регуляции экспрессии генов у фагов группы phiKZ имеет важное прикладное значение. В связи с этим, работа М.В. Якуниной весьма актуальна, так как вносит свой вклад в понимание особенностей развития инфекции фагами группы phiKZ патогенных бактерий, что позволит в будущем разработать инновационные подходы к получению новых антимикробных препаратов.

В диссертационной работе М.В. Якуниной впервые были выявлены важные закономерности в регуляции транскрипции генома фага phiKZ:

-при исследовании транскрипции у гигантского бактериофага phiKZ было обнаружено, что, в отличие от подавляющего большинства ранее известных бактериофагов, вышеуказанный фаг использует для транскрипции исключительно собственные уникальные мсРНКП и не зависит от РНКП клетки-хозяина;

-впервые была выделена одна из мсРНКП бактериофага phiKZ и охарактеризована ее функциональная активность, а также взаимодействие с промотором;

-впервые были получены данные о том, что в состав невирионного набора белков вируса ϕ KZ входит пятая субъединица мсРНКП комплекса, но ее функция остается пока неизвестной;

-невирионная РНКП (нвРНКП) контролирует специфическую транскрипцию с поздних промоторов фага ϕ KZ и является устойчивой к воздействию рифампицина,

-для транскрипции поздних промоторов абсолютно необходимы все четыре нуклеотиды поздних промоторов, а также последовательность после точки старта транскрипции.

Общая характеристика работы

Диссертация довольно компактна по объему (85 страниц), построена по традиционному плану и состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, результаты и выводы, список цитируемой литературы, содержащий 124 наименования и приложение.

Материалы диссертации иллюстрированы 28 рисунками и 3 таблицами. В обзоре литературы довольно детально описаны современные данные по регуляции бактериальной транскрипции, включая инициацию транскрипции, элонгацию и ее терминацию. Также описывается транскрипция и экспрессия фаговых белков в процессе инфекции у различных бактериофагов. Особое место в обзоре отведено описанию различных РНК полимераз: как канонических односубъединичных и многосубъединичных ферментов, так и неканонических многосубъединичных РНК полимераз. Приведены данные об особенностях фага ϕ KZ, который был изолирован и впервые описан В.Н. Крыловым и И.Ж. Жазыковым в 1978 г. (Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, г. Москва).

В своей диссертационной работе М.В. Якунина использовала широкий спектр современных методов бактериологии, молекулярной биологии, биохимии и биоинформатики, которые включали в себя:

культивирование бактериофага и получение биомассы инфицированных им клеток, очистку РНКП комплексов с помощью многостадийной колоночной хроматографии, масс-спектрометрический анализ субъединиц РНКП, анализ транскрипционной активности РНКП, поиск регуляторных элементов в промоторах поздних генов с помощью реакции удлинения праймера (РУП), сайт-направленный мутагенез, а также биоинформатический

поиск межвидовых гомологий у различных субъединиц РНКП на уровне аминокислотных остатков. Все использованные в работе методы адекватны поставленным задачам.

Из несомненных достоинств работы хочется отметить хорошо и аккуратно сформулированные положения, выносимые на защиту и выводы. Также впечатляет объем проделанной работы по очистке РНКП комплексов с помощью колоночной хроматографии, в результате которой была разработана схема очистки нативной невирионной РНКП (нвРНКП) до гомогенности без использования конструкций с аффинными эпитопами.

Несмотря на то, что функция пятой субъединицы нвРНКП бактериофага ϕ KZ пока не определена, диссертанту удалось проделать большой объем работы по идентификации и описанию остальных четырех субъединиц этого комплекса. По всей видимости, нвРНКП осуществляет транскрипцию поздних промоторов фага. При этом консенсусной последовательности TATG не достаточно для полноценной транскрипции, что указывает на наличие дополнительных структурных (и/или регуляторных) элементов в промоторах поздних генов, которые узнаются нвРНКП. Также весьма неожиданным оказался другой экспериментальный результат, свидетельствующий о том, что бактериофаг ϕ KZ не использует РНКП хозяйской клетки, а кодирует две собственные РНКП. В согласии с этими данными, биоинформатический анализ промоторов генома фага показал отсутствие явных мотивов для связывания бактериальной регуляторной субъединицы σ^{70} .

Все эти экспериментальные данные несомненно добавляют новизны этому исследованию и задают направление для последующей работы.

Несмотря на очевидный успех работы в целом, работа не лишена недостатков, которые, впрочем, в основном относятся к оформлению диссертации:

1. Впечатляет количество орфографических и грамматических ошибок, которыми изобилует начало диссертации.
2. Не приведена нумерация рисунка (ов) в Приложении. Непонятно, это один большой составной рисунок, или несколько отдельных.
3. В разделе по масс-спектрометрии не приведен процент FDR (False Discovery Rate), используемый для идентификации пептидов, что затрудняет оценку достоверности полученных данных относительно базы MASCOT. Также не приведено данных по количеству идентифицированных пептидов и их последовательностей на каждую

субъединицу комплекса. Включение этих данных в описание экспериментальной части существенно бы усилило общее впечатление от работы.

Высказанные замечания не снижают высокий научный уровень диссертационной работы. По теме диссертации опубликованы 8 печатных работ, в том числе 3 статьи (из них 2 входят в перечень рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ), а также 5 тезисов конференций. Материалы диссертации были представлены на Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «МОЛОДАЯ ФАРМАЦИЯ-ПОТЕНЦИАЛ БУДУЩЕГО» (Санкт-Петербург, 2013), на научно-практической конференции с международным участием «XLII Недели науки СПбГПУ» (Санкт-Петербург, 2013), 38th FEBS Congress (Санкт-Петербург, 2013), Total Transcription (Кембридж, Англия, 2014), международной конференции «Наука будущего» (Санкт-Петербург, 2014), а также на межлабораторных семинарах в НИК «Нанобиотехнологии» Санкт-Петербургского Политехнического Университета имени Петра Великого и Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Заключение

В целом, диссертация М.В. Якуниной, выполненная на высоком научном и методическом уровне, заслуживает высокой оценки; в ходе ее выполнения получены новые данные по актуальной проблеме. Считаю, что диссертационная работа М.В. Якуниной «Функциональная активность и биохимические свойства невирионной многосубъединичной РНК-Полимеразы бактериофага РНКZ», выполненная под руководством д.б.н., профессора Константина Викторовича Северинова, является законченной квалификационной работой, содержит новые данные о механизмах регуляции транскрипции за счет невирионной многосубъединичной РНК-Полимеразы гигантского бактериофага РНКZ. Считаю, что диссертация соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к кандидатским диссертациям, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Заведующий лаборатории регуляции экспрессии генов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института цитологии Российской академии наук,
доктор биологических наук по специальности: 03.00.25

03.12.2016



Н.А. Барлев

Адрес: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии Российской академии наук,
Телефон: +7 (812) 297-18-29, +7 (812) 297-18-34
Email: cellbio@incras.ru
Сайт: <http://www.cytspb.rssi.ru/>

Подпись д.б.н. Н.А. Барлева заверяю
Ученый секретарь

