

Федеральное агентство научных организаций
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И ФИЗИОЛОГИИ МИКРООРГАНИЗМОВ
ИМ. Г.К. СКРЯБИНА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИБФМ РАН)

142290 г. Пушкино, Московской обл, просп. Науки 5,
Телефон: (495) 625-74-48, факс: (495) 956-33-70; 632-78-70
E-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru, www.ibpm.pushchino.ru
ИНН/КПП 5039000146/503901001

30.11.2016г № 114/01,2-03.4-1

на № _____ от _____



Директор ИБФМ РАН,
чл.- корр., профессор А.М. Боронин

ОТЗЫВ

ведущей организации
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 исследования

Одной из приоритетных задач молекулярной биологии является изучение всех аспектов функционирования ДНК-зависимой РНК-полимеразы (РНКП), осуществляющей транскрипцию генов. Как известно, существует два эволюционно неродственных класса канонических полимераз: односубъединичные (ос) и многосубъединичные (мс) РНКП. ОсРНКП найдены в митохондриях и хлоропластах. Также к данному классу относятся практически все ранее изученные РНКП бактериофагов. МсРНКП транскрибируют гены бактерий, архей и эукариот. Недавно в нескольких работах, на основании анализа базы данных полных геномов методами биоинформатики, было сделано предположение о существовании неканонических мс РНКП, для которых характерна крайне ограниченная область гомологии с каноническими мсРНКП в районе активного центра. В частности, у группы phiKZ-подобных гигантских бактериофагов были предсказаны две неканонические мсРНКП, предполагаемые субъединицы которых гомологичны β и β' субъединицам бактериальных РНКП. Вероятно, произойдя от бактериальных полимераз, РНКП phiKZ-подобных фагов в ходе своей эволюции сохранили в основном только те структуры, которые абсолютно необходимы для катализа

ДНК-зависимого синтеза РНК. Работа Марии Вячеславовны посвящена изучению функциональной активности одной из двух мсРНКП бактериофага ϕ KZ и ее роли в транскрипции фагового генома. Результаты этих исследований вносят существенный вклад в понимание механизма работы многосубъединичных РНК полимераз.

Все вышеперечисленное позволяет заключить, что исследование принципиально нового уникального фермента, фаговой мсРНКП, выполненное М.В. Якуниной, является безусловно актуальным.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертация написана по традиционному плану, представлена на 85 страницах машинописного текста, состоит из следующих глав: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, результаты и выводы. Список, использованной литературы, содержит 124 наименования. Материалы диссертации также включают 28 рисунков, 3 таблицы и 1 приложение.

Во введении автор обосновал актуальность исследований, сформулировал цели и задачи своей работы, привел данные о научной новизне исследования и его практической и теоретической значимости. Кроме того, во введении указаны сведения об апробации материалов диссертационной работы, выполненной в виде публикаций в рецензируемых журналах и выступлениях на российских и международных конференциях.

Обзор литературы включает разделы посвященные описанию разнообразия бактериофагов в природе, известным механизмам регуляции транскрипции фаговых геномов и современным данным о канонических классах ДНК-зависимых РНК-полимераз. Кроме того в обзоре литературы собраны данные о предсказанных неканонических многосубъединичных РНКП и дано достаточно подробное описание основного объекта исследования, а именно, группы ϕ KZ-подобных бактериофагов. Представленный обзор является достаточно полным и дает представление о современном состоянии исследований в области интересов автора.

В главе «Материалы и методы» приведены подробные описания используемых в работе штаммов бактерий, методов биоинформатического анализа и методик экспериментальной работы. Вызывает уважение объем работы, проведенной автором для подборки хроматографических стадий выделения невирионной РНКП из инфицированных клеток с использованием масс спектрометрии с высоким разрешением. Это позволило получить чистый препарат фермента в достаточном количестве для проведения функциональных исследований.

В разделе «Результаты и обсуждение» описаны экспериментальные процедуры и проведен анализ полученных результатов. Автором выявлена группа гигантских бактериофагов, помимо ϕ KZ-подобных, в геномах которых вероятно закодированы две фаговые мсРНКП. Для одного из представителей данной группы фагов – бактериофага ϕ KZ - изучена регуляция транскрипции генома. Для него определены временные классы генов и нуклеотидные мотивы, ассоциированные с промоторами всех временных классов. Также показано, что РНКП клетки-хозяина не участвует в развитии инфекции клеток фагом ϕ KZ. На этом основании автором сделано предположение, что транскрипция генома данного фага осуществляется исключительно собственными полимеразы. Исследование функциональной активности выделенной фаговой невирионной полимеразы показало, что она, по-видимому, отвечает за транскрипцию поздних генов и устойчива к воздействию рифампицина. Также показано, что для узнавания поздних промоторов невирионной РНКП необходимы все четыре нуклеотида мотива поздних промоторов, а также участок ДНК после точки старта транскрипции.

В «Заключении» диссертационной работы приведен обобщенный итог исследования и представлены выводы, сделанные из анализа полученных результатов. Степень обоснованности научных положений и выводов не вызывает сомнений.

По результатам диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых международных и отечественных научных журналах из перечня изданий, рекомендованных ВАК РФ, а также 5 тезисов докладов на международных и отечественных конференциях.

Новизна диссертационного исследования

В диссертационной работе М.В. Якуниной впервые была исследована транскрипция группы гигантских бактериофагов, кодирующих два набора белков гомологичных фрагментам каталитических субъединиц бактериальных мсРНКП. На примере бактериофага ϕ KZ показано, что в отличие от подавляющего большинства ранее известных бактериофагов транскрипция генома ϕ KZ не зависит от РНКП клетки-хозяина и осуществляется исключительно собственными уникальными мсРНКП. Впервые выделена одна из мсРНКП бактериофага ϕ KZ, и частично охарактеризована ее функциональная активность.

Теоретическая значимость работы состоит в открытии нового фермента первой многосубъединичной РНК полимеразы бактериофагов. Сравнительный анализ данного фермента с известными полимеразы бактерий и эукариот расширяет знание о том как возникли и эволюционировали эти ферменты. Полученные данные могут быть использованы научными работниками, ведущими исследования в соответствующих направлениях, а также в лекциях для студентов биологических факультетов университетов и медицинских институтов.

Практическая значимость. Представители группы гигантских бактериофагов, кодирующих мсРНКП, инфицируют широкий спектр бактерий, в том числе и клинически важные патогены *Pseudomonas*, *Yersinia* и *Salmonella*. Данные патогены часто представлены антибиотико-устойчивыми штаммами, в результате чего лечение заболеваний, вызванных ими, представляют существенную проблему для современной медицины. ϕ KZ и родственные ему фаги рассматриваются как возможные компоненты фаговых коктейлей для лечения инфекций, вызванных этими бактериями, а также как перспективный источник фаговых белков-ингибиторов специфически влияющих на бактерий-хозяев. Полученные в диссертационной работе данные о регуляции экспрессии генов этих фагов позволят разработать новые антимикробные препараты, используя знания об особенностях развития инфекций бактерий ϕ KZ-родственными фагами.

Замечания

Диссертационное исследование М.В. Якуниной не лишено незначительных замечаний по оформлению работы. В первую очередь хочется отметить, что в название двух подразделов присутствует слово результаты, в главе «Результаты и обсуждения» и в части «Результаты и выводы». Очевидно, что диссертант хотел подчеркнуть, что не все заключения, сделанные в рамках данной работы можно отнести к выводам, в частности такой важный результат как разработка схемы очистки нвРНКП бактериофага ϕ KZ к ним не относится. В то же время было бы лучше не использовать одно и то же слово в наименование разделов диссертации дважды. Кроме этого хочется отметить, что ряд иллюстраций приведены с использованием терминов на английском языке и в тексте присутствуют опечатки.

Однако, высказанные замечания не снижают высокий научный уровень диссертационной работы.

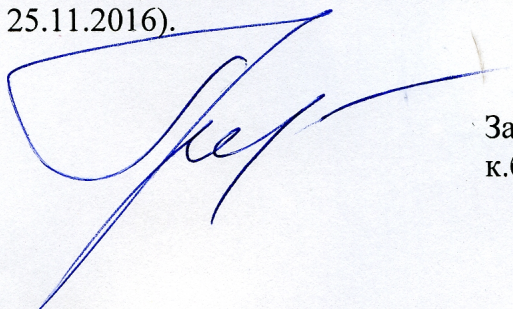
Заключение

Диссертация М.В. Якуниной выполнена на высоком научном и методическом уровне и заслуживает высокой оценки. В ходе выполнения диссертации получен ряд приоритетных данных по исследованию транскрипции бактериофагов и функциональной

активности неканонических многосубъединичных РНКП. Содержание автореферата полностью отражает основные результаты, изложенные в диссертации.

Диссертационная работа Якуниной Марии Вячеславовны «Функциональная активность и биохимические свойства невирионной многосубъединичной РНК-полимеразы бактериофага phiKZ», выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора Константина Викторовича Северинова, представляет собой законченное исследование и является научной квалификационной работой, содержащей новые данные о регуляции транскрипции бактериофага phiKZ и функционирование одной из его уникальных многосубъединичных РНК-полимераз. Диссертация соответствует всем 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.

Отзыв рассмотрен и утвержден на заседании Ученого совета Федерального государственного бюджетного научного учреждения Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина Российской академии наук (протокол № 6 от 25.11.2016).



Зав. лаб. энзимологии генетических процессов,
к.б.н. И.Э. Грановский

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук.

Почтовый адрес: Российская Федерация, 142290, Московская область,
г. Пущино, проспект Науки, 5.

Эл.почта: boronin@ibpm.pushchino.ru

Тел.: +7 (495) 625-74-48



Подпись: Грановского И.Э.
Зав. канцелярией
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов
им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук