

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.230.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ПО ДИССЕРТАЦИИ **ЯКУНИНОЙ МАРИИ ВЯЧЕСЛАВОВНЫ**
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 23 декабря 2016 года № 216/395

О присуждении **ЯКУНИНОЙ МАРИИ ВЯЧЕСЛАВОВНЕ** (Россия) ученой степени кандидата биологических наук

Диссертация **«ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ И БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НЕВИРИОННОЙ МНОГОСУБЪЕДИНИЧНОЙ РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ БАКТЕРИОФАГА РНКZ»**

по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»

принята к защите 21.10.2016 г., протокол №213/382 Диссертационным советом Д 002.230.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН), адрес: 194064, Россия, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4., утвержден приказом Минобрнауки РФ №105/нк от 11.04.2012 г.

Соискатель Якунина Мария Вячеславовна, 1986 года рождения, в 2009 году окончила факультет медицинской физики и биоинженерии Санкт-Петербургского государственного политехнического университета по специальности «прикладные математика и физика» по профилю специализации «физико-химическая биология и биотехнологии», с присвоением степени магистра. С **01. 07. 2012** по **01. 07. 2016** проходила очную аспирантуру в Санкт-Петербургском политехническом университете Петра Великого (СПбПУ) – Лаборатории молекулярной микробиологии Научно-исследовательского комплекса «Нанобиотехнологии». Диссертация выполнена в порядке прохождения аспирантуры.

С июля 2013 по настоящее время **работает** инженером-исследователем в Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» в научно-исследовательском комплексе «Нанобиотехнологии».

Диссертация выполнена в Лаборатории молекулярной микробиологии, НИК «Нанобиотехнологии» Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Научный руководитель – Константин Викторович Северинов, доктор биологических наук (по специальности: 03.01.07 – "Молекулярная

генетика"), профессор, заведующий лабораторией молекулярной микробиологии ФГАОУ ВО «СПбПУ», Санкт-Петербург.

Официальные оппоненты:

1. **Николай Анатольевич Барлев**, доктор биологических наук (по специальности: 03.03.04 – "Клеточная биология, цитология, гистология"), заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук, г. Санкт-Петербург

2. **Константин Анатольевич Мирошников**, доктор химических наук (по специальности: 03.01.04 - Биохимия и 03.01.06 – Биотехнология), кандидат биологических наук (по специальности: 03.01.03 Молекулярная биология и 03.01.04 Биохимия), заведующий лабораторией молекулярной биоинженерии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, г. Москва

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина Российской академии наук (г. Пущино, Московская область) в своем отзыве (заключение составлено заведующим лабораторией энзимологии генетических процессов ФГБУН ИБФМ РАН к.б.н. (специальность 03.01.03 – «Молекулярная биология») И.Э. Грановским и утверждено директором ИБФМ РАН д.б.н., член-корреспондентом РАН, профессором А. М. Борониным) указала, что диссертационная работа является законченной научно-квалификационной работой, содержит решение актуальной задачи об исследовании функционирования уникальных многосубъединичных ДНК-зависимых РНК-полимераз (РНКП), кодируемых гигантскими бактериофагами, что имеет огромное научно-практическое значение для молекулярной биологии. По актуальности, новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов работа соответствует требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология», и

дала положительный отзыв на диссертацию.

Соискатель имеет 8 опубликованных работ по теме диссертации, из них 3 статьи (объемом 2,1 п.л.) в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, включая такое авторитетное издание, как Nucleic acid research

(Импакт фактор 9,2), и 5 тезисов докладов на 3 международных и 2 отечественных конференциях.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. **Якунина М.В.**, Воронцова Д.Н., Минахин Л.С. Неканонические РНК-полимеразы гигантских бактериофагов типа phiKZ // Научно-технические ведомости СПбГПУ. Физико-математические науки. – 2013. – №1(165) – С.120-126

В рамках данной статьи с помощью методов биоинформатики проведен анализ субъединиц двух предполагаемых РНКП, кодируемых в геномах phiKZ-подобных бактериофагов, заражающих бактерии рода *Pseudomonas*. Было показано, что в предполагаемых субъединицах гомологичных N-части β' - субъединицы бактериальных РНКП, в аминокислотных последовательностях содержится универсальный Mg-связывающий мотив абсолютно необходимый для катализа. Кроме того было предположено, что в двух фаговых геномах (из 5 рассматриваемых в статье) кодирующая последовательность данного мотива прерывается интроном. Также в статье обсуждается отсутствие бактериальных промоторов типа -10/-35 в геноме фага phiKZ и наличие специфического мотива фаговых ранних промоторов. В заключительной части статьи выдвинута гипотеза о том, что транскрипция генома фага phiKZ осуществляется без участия бактериальной РНКП.

2. Ceysens P.J., Minakhin L., Van den Bossche A., **Yakunina M.**, Klimuk E., Blasdel B., De Smet J., Noben J.P., Bläsi U., Severinov K., Lavigne R. Development of giant bacteriophage phiKZ is independent of the host transcription apparatus // Journal of Virology – 2014. – Vol. 88. – P. 10501-10510

Статья посвящена исследованию транскрипции генома бактериофага phiKZ во время инфекции бактериальных клеток. С помощью секвенирования тотальной РНК, выделенной из инфицированных клеток на разных минутах инфекции, было показано, что гены бактериофага phiKZ можно разделить на три классических временных класса: ранние, средние и поздние. Для каждого класса промотора были определены нуклеотидные мотивы, ассоциированные с промоторами. Кроме того было показано, что РНКП клетки-хозяина не участвует в транскрипции фагового генома. Также в статье продемонстрировано, что для транскрипции ранних генов фага не требуется синтеза новых фаговых белков, в то время как для транскрипции средних и поздних генов синтез новых белков на рибосомах необходим. Основываясь на полученных результатах, было сделано предположение, что вирионная РНКП попадает в бактериальную клетку вместе с ДНК и осуществляет транскрипцию ранних генов, а невирионная РНКП синтезируется позже в процессе

инфекции и транскрибирует средние и/или поздние гены. Была проанализирована база данных полных геномов и было выявлено 13 геномов гигантских бактериофагов, кодирующих 2 многосубъединичные РНКП гомологичные РНКП фага phiKZ. Данное наблюдение говорит о том, что впервые обнаруженная в этой работе транскрипционная схема может быть распространена во всей группе найденных фагов.

3. **Yakunina M**, Artamonova T, Borukhov S, Kira S. Makarova, Severinov K, Minakhin, L. A non-canonical multisubunit RNA polymerase encoded by a giant bacteriophage // *Nucleic Acids Research*. - 2015. - Vol. 43. – P. 10411-10420.

В статье представлены результаты исследования фаговой многосубъединичной невирионной ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Описана разработанная схема выделения функционально-активного фермента из инфицированных клеток. Выделенный комплекс состоит из 5 субъединиц: 4 субъединицы являются ранее предсказанными субъединицами гомологичными фрагментами β и β' – субъединицам бактериальных РНКП, а гомологов 5 субъединицы с известной функцией не найдено. Показано, что невирионная РНКП узнает поздние промоторы в опытах по транскрипции *in vitro* с *in vivo* специфичностью и устойчива к воздействию антибиотика рифампицина, известного ингибитора бактериальной РНКП. Также было показано, что для эффективной транскрипции поздних промоторов абсолютно необходимы все четыре нуклеотида мотива поздних промоторов, а также область после точки старта транскрипции.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Доктора биологических наук, заведующего лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУН Института молекулярной генетики РАН **Андрея Владимировича Кульбачинского**. Отзыв положительный, имеются замечания: «..... У меня есть два небольших критических замечания к работе. Во-первых, на рисунке 3 приведены кривые зависимости титра бактериофагов от времени инфекции, стоило бы указать ошибки измерений, или хотя бы написать, были ли у этого эксперимента независимые повторности (так как в одной из последних точек есть некоторые различия в титре фага в зависимости от добавления рифампицина). Во-вторых, на рисунке 6Г видно, что фаговая РНК-полимераза все-таки немного активна на промоторе средних генов, а клеточная полимеразы – на позднем фаговом промоторе, так что на основе этого эксперимента нельзя утверждать, что имеется абсолютная специфичность в узнавании промоторов (как сказано на стр. 13). Сделанные замечания несколько не снижают общей ценности работы».

2. Доктора биологических наук, профессора, заведующего лабораторией эпигенетики развития ФГБУН Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН **Сурена Миначовича Закияна**. Отзыв положительный, без замечаний.
3. Кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника ФГБУН Институт цитологии РАН **Анны Сергеевны Цимохи**. Отзыв положительный, без замечаний.
4. Кандидата биологических наук, директора Федерального государственного бюджетного учреждения Научно-исследовательский институт гриппа Министерства здравоохранения РФ **Андрея Владимировича Васина**. Отзыв положительный, без замечаний.
5. Кандидата физико-математических наук, старшего научного сотрудника ФГБУН Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН **Евгении Игоревны Дерюшевой**. Отзыв положительный, имеется незначительное замечание: «.....Автореферат написан хорошим языком, хотя и не без незначительных опечаток...»
6. Кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова **Дмитрия Михайловича Байтина**. Отзыв положительный, имеются замечания:
«...Выводы представляют собой перечисление основных результатов работы в сжатой форме. Помимо этого, желательно было бы провести некоторое обобщение полученных результатов».

В дискуссии принимали участие:

1. Доктор медицинских наук, профессор М.М. Шавловский, член Диссертационного совета;
2. Доктор физико-математических наук А.Л. Тимковский, член Диссертационного совета;
3. Доктор биологических наук Д.С. Боголюбов, член Диссертационного совета;
4. Доктор биологических наук, профессор С.Н. Борхсениус, заместитель председателя Диссертационного совета;
5. Доктор биологических наук С.Ю. Хайтлина, член Диссертационного совета;
6. Кандидат биологических наук Ю.Я. Соколова, старший научный сотрудник ИНЦ РАН.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией выбранных специалистов в области молекулярной биологии, в частности, в области изучения регуляции

транскрипции, а также в исследовании бактериофагов, для более объективной оценки результатов, представленных в диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана схема выделения уникальной невирионной ДНК-зависимой РНК-полимеразы (РНКП) бактериофага *phiKZ* из инфицированных клеток. Эта схема позволила впервые получить очищенный препарат уникальной многосубъединичной РНКП, кодируемой *phiKZ*-родственными бактериофагами и определить ее полный субъединичный состав с помощью метода высокоразрешающей масс-спектрометрии. Кроме того метод получения невирионной РНКП (нвРНКП) сделал возможным ее последующее исследование;

предложена оригинальная модель транскрипции бактериофага *phiKZ*;

доказано, что в геноме фага *phiKZ* присутствуют гены трех временных классов: ранние, средние и поздние, для которых определены нуклеотидные мотивы, ассоциированные с промоторами всех классов генов. Показано, что РНКП клетки-хозяина не участвует в развитии инфекции клеток фагом *phiKZ*. Вероятно, транскрипция всех фаговых генов осуществляется двумя фаговыми РНКП. Показано, что нвРНКП состоит из четырех субъединиц гомологичных каталитическим субъединицам бактериальной РНКП и пятой субъединицы с неизвестной функцией. Показано, что нвРНКП *in vitro* осуществляет специфическую транскрипцию с поздних промоторов фага *phiKZ* и является устойчивой к воздействию рифампицина. Показано, что для транскрипции поздних промоторов абсолютно необходимы все четыре нуклеотида мотива поздних промоторов, а также область после точки старта транскрипции.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения, расширяющие представления о классе многосубъединичных РНКП и их эволюции;

применительно к проблеме, изучаемой в диссертации, результативно использован широкий арсенал современных физических методов и методов молекулярной биологии, включая методы высокоразрешающей масс-спектрометрии, классических биохимических методик, в том числе хроматографии, микробиологических подходов и т.д.;

изложены новые экспериментальные данные о системе транскрипции генома *phiKZ*-подобных бактериофагов и уникальной фаговой многосубъединичной РНК-полимеразе;

раскрыта принципиально новая стратегия регуляции транскрипции фаговых геномов;

изучена транскрипция генома фага *phiKZ* и функциональная роль в ней невирионной РНК-полимеразы данного фага;

проведена модернизация методик экспериментов по *in vitro* транскрипции для работы с нвРНКП фага *phiKZ*;

Значение полученных соискателем результатов для практики подтверждается тем, что:

Определена группа фагов, инфицирующая ряд важных клинических патогенов, из 14 представителей, кодирующая в своих геномах 2 многосубъединичные РНКП гомологичных полимеразам, идентифицированным в бактериофаге phiKZ;

сформированы представления об основных стадиях развития инфекции бактериальной клетки-хозяина бактериофагом phiKZ и основных мишенях для регуляции транскрипции генома, обеспечивающих переход со стадии на стадию;

представлены доказательства существования фаговой многосубъединичной РНКП, отличающейся от ранее известных ферментов данного класса. Полученные данные используются в образовательном курсе «Основы молекулярной биологии», который проводится на базе НИК «Нанобиотехнологии» для студентов третьего курса кафедры «Биофизика» СПбПУ Петра Великого.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты, представленные в диссертации, получены на сертифицированном оборудовании; выбор использованных методов обоснован спецификой работы и соответствует поставленным в работе задачам; показана воспроизводимость результатов исследования,

теория построена на известных, проверенных данных и согласуется с опубликованными исследованиями по теме диссертации и по смежным отраслям;

идея базируется на обобщении и анализе полученных в ходе работы экспериментальных данных, а также их сопоставления с современными литературными данными;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассматриваемой тематике;

установлено, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обосновано;

использованы современные экспериментальные подходы и адекватные методы анализа данных.

Личный вклад соискателя состоит в:

активном участии в определении направления и постановке задач исследований, выборе и обосновании методик экспериментов, анализе полученных результатов и интерпретации экспериментальных данных. Автор принимал непосредственное участие в апробации результатов исследований на отечественных и зарубежных научных конференциях, в подготовке и написании статей и тезисов по теме диссертации.

Диссертация, посвященная изучению функциональной активности и биохимических свойств невирионной многосубъединичной РНК-полимеразы бактериофага phiKZ, является законченным (в рамках поставленных задач)

научно-квалификационным исследованием в области молекулярной биологии, которое содержит решение научной задачи, имеющей большое значение для понимания механизмов работы РНК-полимераз и их эволюции. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных М.В. Якуниной работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. Диссертационная работа полностью отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года) по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

На заседании 23 декабря 2016 г. Диссертационный совет принял решение присудить **Якуниной Марии Вячеславовне** ученую степень **кандидата биологических наук** по специальности **03.01.03 – «Молекулярная биологии»**.

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 7 докторов по специальности рассматриваемой диссертации, участвующих в заседании, из 24 человек, входящих в состав Совета, проголосовали:

«ЗА» - 18, «ПРОТИВ» - НЕТ, недействительных бюллетеней нет.

Председатель заседания

Зам. председателя

Диссертационного совета Д 002.230.01

на базе ИЦ РАН,

доктор биологических наук, профессор



С.Н. Борхсениус

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 002.230.01

на базе ИЦ РАН,

кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

«26» декабря 2016 г.