

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Склярской С.А. «Структурная организация и механизмы действия ФМН-зависимых рибопереклочателей у бактерий», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - Генетика.

Диссертационная работа Склярской С.А. посвящена изучению регуляторных функций РНК; эта проблема в настоящее время привлекает огромное внимание исследователей регуляции экспрессии генов. Исследования, проводимые в этой области, в последние годы были дополнены открытием некодирующих сенсорных РНК (рибопереклочателей), которые способны без участия белков-посредников узнавать различные клеточные метаболиты и взаимодействовать с ними, что приводит к изменению конформации лидерной мРНК и, как следствие этого, к выключению или, в меньшем количестве случаев, к включению экспрессии генов-мишеней. Такой способ регуляции экспрессии генов широко распространен среди различных организмов, в первую очередь, микроорганизмов различных таксономических групп. В связи с выше сказанным, изучение этого типа регуляции, несомненно, актуально и имеет не только важное фундаментальное, но и существенное прикладное значение, которое пока еще не реализуется в достаточной мере.

Диссертация Склярской С.А. является продолжением серии приоритетных работ, выполненных в лаборатории А.С. Миронова в рамках этой тематики. Целью работы было исследование механизмов функционирования рибопереклочателей у бактерий, конкретно, ФМН-зависимых рибопереклочателей экспрессии генов, связанных с синтезом и транспортом рибофлавина. Выбор этой модели совершенно оправдан, т.к. вопросы генетического контроля синтеза рибофлавина в течение ряда лет глубоко и детально исследуются в лаборатории научного руководителя диссертационной работы проф. А.С. Миронова. Изучение роли ФМН-зависимых рибопереклочателей в регуляции экспрессии генов проводилось на двух объектах – *Bacillus subtilis* и *Escherichia coli*.

Диссертация построена традиционно. Она содержит введение, в котором представлены задачи работы, четко описана новизна полученных данных и их практическая значимость. Обзор литературы также очень четко и логично написан, он показывает эрудицию автора и его способность критически анализировать имеющиеся литературные данные. Обзор литературы состоит из двух глав. В первой главе подробно рассмотрены пути биосинтеза рибофлавина и его производных, ферменты, участвующие в

синтезе рибофлавина, и генетический контроль его синтеза. Во второй главе литературного обзора автор подробно анализирует информацию о регуляции экспрессии генов с помощью рибопереключателей у бактерий. Этот непростой материал является полезной сводкой информации по указанному вопросу.

Обширный раздел «Материалы и Методы» включает описание большого количества современных молекулярных и генетических методов исследования, включающих арсенал методов генетической инженерии, конструирование транскрипционных и трансляционных фьюзов, сайт-направленный мутагенез, выделение РНК, определение стартов транскрипции, различные методы изучения транскрипции, различные методы ИЦР, тоупринт анализ и др. Даже простое перечисление методов, использованных в работе, свидетельствует о высоком методическом мастерстве диссертантки, которое она и продемонстрировала при выполнении работы.

Экспериментальная часть диссертации включает большой объем приоритетных результатов. Не перечисляя все из них, суммирую наиболее существенные. Т.к. диссертация посвящена изучению роли рибопереключателей в регуляции экспрессии генов, связанных с синтезом рибофлавина, логично, что эта работа была начата с определения организации, регуляции функционирования и роли промоторов рибофлавинового оперона. С помощью метода достройки праймера были определены сайты старта транскрипции трех промоторов этого оперона; функции и регуляция внутренних промоторов рибофлавинового оперона не были исследованы ранее. Была определена сила трех промоторов рибофлавинового оперона, уровень транскрипции генов *rib*-оперона с этих промоторов. В результате было убедительно доказано, что основной вклад в регуляцию транскрипции генов этого оперона вносит промотор P1, активность которого зависит от ФМН; активность двух внутренних промоторов P2 и P3 не регулировалась флавинами. В ходе этой работы было выяснено, что активность внутреннего промотора P2 на два порядка ниже, чем активность P1, а активность промотора P3 в 5 раз выше, чем у P1. Представляет интерес продолжить эти исследования и изучить функциональную роль и значимость внутренних промоторов *rib*-оперона.

Ряд принципиально новых существенных данных получен диссертантом во второй части работы при исследовании регуляции экспрессии гена *uraA* *B. subtilis*, продукт которого участвует в транспорте рибофлавина в клетку из окружающей среды. Прежде всего, был впервые установлен сайт старта транскрипции этого гена и определена структура его промотора. Затем для проверки предположительной модели регуляции экспрессии этого гена с участием рибопереключателей были получены мутации в лидерной области мРНК и делеция в аптамерной части (в *rfa* – элементе). Изучение экспрессии транскрипционных и трансляционных фьюзов в клетках дикого типа и мутантов, определение транскрипции в

присутствии ФМН и без него, проведение тоупринт-анализа позволили выяснить механизмы действия ФМН-переключателя в регуляции гена *uraA*. Было установлено, что связывание ФМН с лидерной мРНК этого гена приводит к образованию Rho-независимого терминатора транскрипции, что вызывает снижение экспрессии гена. Кроме того, в присутствии ФМН блокируется формирование инициаторного комплекса 30S субъединицы рибосомы с SD-сайтом лидерной мРНК гена *uraA*. Результаты этих исследований позволили сформулировать гипотезу «динамической регуляции» экспрессии гена *uraA* с участием ФМН-зависимого рибопереключателя, объясняющую двойственное действие рибопереключателя на уровне терминации транскрипции и на уровне инициации трансляции – секвестрирования сайта связывания рибосомы.

Еще одна очень интересная и существенная находка диссертанта – это обнаружение Склярновой С.А. нового механизма функционирования рибопереключателей при изучении регуляции экспрессии гена *ribB* *E. coli*. Было показано, что при взаимодействии ФМН с лидерной мРНК этого гена формируется структура, обуславливающая связывание фактора Rho, которое приводит к ингибированию экспрессии гена *rib* вследствие Rho-зависимой терминации транскрипции. Таким образом, в диссертационной работе были продемонстрированы три типа механизмов функционирования ФМН-зависимых рибопереключателей: ингибирование транскрипции в результате формирования Rho-независимого терминатора транскрипции; нарушение инициации трансляции в результате формирования шпильки секвестра, блокирующей SD последовательность, и подавление транскрипции вследствие формирования альтернативной структуры, связывающейся с Rho фактором. При этом, как показало изучение регуляции экспрессии гена *uraA*, первые два механизма могут осуществляться одним рибопереключателем.

Выше сказанное свидетельствует о том, что при выполнении диссертационной работы Склярновой С.А. были получены новые приоритетные данные, внесшие существенный вклад в изучение механизмов действия рибопереключателей и их функциональной роли в регуляции экспрессии генов бактерий.

Диссертационная работа Склярновой С.А. не вызывает серьезных критических замечаний. Имеются лишь небольшие недочеты, связанные, в основном, с оформлением диссертации. Например, следовало бы привести более подробное объяснение к рисунку 5. Рисунок 15 является повторением рисунка 3. В диссертации имеются опечатки и некоторые неудачные фразы. Все это, конечно, ни в коей мере не снижает ценности работы.

Оценивая работу в целом, следует заключить, что диссертационная работа Склярновой С.А. заслуживает самой высокой оценки. Она является серьезным, глубоким исследованием, выполненным на самом современном уровне. Достоверность и новизна полученных

результатов не вызывают сомнений. Выводы, представленные в диссертации, убедительны, они основаны на большом фактическом материале и полностью вытекают из представленных экспериментальных данных, полученных в результате сложной, скрупулезной работы, проведенной с использованием большого количества молекулярно-биологических и генетических методов. Основные материалы диссертации опубликованы в научных журналах высокого рейтинга. Автореферат диссертации полностью соответствует полученным экспериментальным данным и содержит основные положения диссертации. Содержащиеся в диссертации сведения и заключения, несомненно, интересны и полезны для исследователей, работающих в области генетики, молекулярной генетики микроорганизмов, биотехнологии.

Диссертационная работа Скляровой Светланы Анатольевны «Структурная организация и механизмы действия ФМН-зависимых рибопереключателей у бактерий» является научно-квалификационной работой, соответствующей критериям, установленным п.7 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации № 74 от 30.01.2002 г. (в редакции постановления правительства Российской Федерации от 20 июня 2011 г. № 475). По актуальности, объему исследований, высокому методическому уровню, приоритетности полученных результатов, научной значимости она полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - Генетика, а ее автор Склярова Светлана Анатольевна, несомненно, заслуживает искомой степени кандидата биологических наук.

Зав. Лабораторией регуляции экспрессии  
генов микроорганизмов  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Института молекулярной генетики  
Российской академии наук, д.б.н., проф.  
Адрес: Москва 123182, пл. Курчатова 2  
Тел. 8-499-1960016  
e-mail: [khmel@img.ras.ru](mailto:khmel@img.ras.ru)

Подпись И.А. Хмель удостоверяю  
Зам. директора ИМГ РАН, д.б.н.



*Хмель*  
И.А. Хмель  
12.05.2014

Б.О. Готов