

ОТЗЫВ

на диссертацию Складовой С.А. «Структурная организация и механизмы действия ФМН-зависимых рибопереключателей у бактерий», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «Генетика» (03.02.07)

Основу роста, развития и выживания любого живого организма, включая бактерии, вирусы и многоклеточные, составляет его способность к четкой и сбалансированной регуляции экспрессии генов в зависимости от его жизненного цикла и разнообразных условий окружающей среды. Чуть более десяти лет назад роль регуляторов, непосредственно влияющих на экспрессию генов, отводилась исключительно белкам. Полученные в начале 2000-х годов первые экспериментальные доказательства того, что существуют участки мРНК способные непосредственно, без участия белковых посредников, связываться с определенными клеточными метаболитами, например, гуанином, аденином, флавиномононуклеотидом (ФМН) и др., благодаря этому менять конформацию лидерной мРНК и таким образом модулировать экспрессию генов и целых оперонов, стали настоящей сенсацией в области биологии. С тех пор у бактерий, архей, растений, грибов и водорослей был открыт и изучен целый ряд таких сенсорных мРНК, названных рибопереключателями. Оказалось, что некоторые из них обладают удивительно сложной и изысканной организацией, нисколько не уступая, а может даже и превосходя в этом известные системы регуляции с участием белковых факторов. Новые открытия в этой области рожают и новые вопросы. Дальнейшее исследование рибосвичей позволяет расширить наши представления о возможных механизмах регуляции экспрессии генов у бактерий, биохимических возможностях РНК, а также открывает новые перспективы для практического применения этих систем в различных сферах биотехнологии и медицины.

Поэтому представленное в рецензируемой диссертации изучение структурной организации и механизмов действия представителей класса ФМН-зависимых рибопереключателей на моделях *rib*-оперона и гена *upaA (fmnP) Bacillus subtilis*, а также гена *ribB Escherichia coli*, безусловно, является актуальным.

В процессе работы автором решались следующие задачи:

1. Установление структуры и особенностей функциональной активности внутренних промоторов *rib*-оперона *B. subtilis*, а также сопоставление основного промотора с внутренними промоторами с точки зрения их значимости для регуляции генов биосинтеза рибофлавина.
2. Проведение детального анализа структурно-функциональной организации лидерной области гена *upaA B. subtilis* и выявление регуляторных элементов, участвующих в контроле экспрессии этого гена.

3. Изучение роли Rho-фактора в ФМН-зависимой регуляции лидерной мРНК гена *ribB* *E. coli*.

Структура диссертации Скляровой С. А. включает разделы: "Введение", "Обзор литературы", "Материалы и методы", "Результаты", "Обсуждение", "Выводы" и "Список литературы". Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, содержит 35 рисунков и 6 таблиц. Список литературы включает 159 источников.

Обзор литературы написан очень хорошим языком, прекрасно структурирован и иллюстрирован, полностью соответствует теме диссертации, и способствует глубокому пониманию экспериментальной части работы. Первая часть обзора посвящена биосинтезу рибофлавина и его производных у бактерий, в основном у *E. coli* и *B. subtilis*, а во второй части подробно рассмотрены и систематизированы различные типы рибопереключателей, описаны известные механизмы их действия. Особое внимание уделено роли ФМН-зависимых рибопереключателей в регуляции генов, вовлеченных в биосинтез и транспорт рибофлавина. Проведенный Скляровой С. А. анализ разнообразных литературных данных убедительно доказывает высокую квалификацию автора, глубокое понимание изложенного материала и четко показывает, что уже было известно по теме настоящей работы к моменту ее выполнения, а что оставалось неисследованным.

Раздел "Материалы и методы" содержит широкий спектр современных молекулярно-генетических и биохимических методов и отражает богатство методического инструментария, использованного автором для решения поставленных задач. Раздел описывает методы введения генетического материала в клетки *E. coli* и *B. subtilis*, конструирование транскрипционных и трансляционных слияний с репортерным геном *lacZ*, сайт-направленный мутагенез, определение старта инициации транскрипции методом удлинения праймера, метод транскрипции *in vitro*, в том числе и на твердой фазе, анализ вторичной структуры РНК (*in-line probing*), тоупринт-анализ, метод количественной ПЦР с применением обратной транскрипции и так далее. Все без лишних подробностей, но четко и исчерпывающе, так, что данный раздел может служить полезным руководством при проведении подобных экспериментов.

Переходя к разделам "Результаты", "Обсуждение" и "Выводы", хочу отметить по настоящему профессиональный уровень изложения материала и высокую научную значимость результатов, полученных в процессе решения поставленных задач.

В ходе исследования экспрессии генов *rib*-оперона *B. subtilis* были определены старты транскрипции внутренних промоторов оперона, показаны сравнительные уровни транскрипционной активности каждого из трех промоторов, установлено, что главную роль в регуляции экспрессии генов *rib*-оперона играет основной промотор P1, а экспрессия с внутренних промоторов P2 и P3 не регулируется флавинами.

В результате подробного изучения регуляции экспрессии гена *uraA* *B. subtilis*, кодирующего транспортер рибофлавина в клетки, было показано, что регуляция происходит как на уровне терминации транскрипции, так и на уровне игибирования инициации трансляции. Для объяснения этого сложного механизма предложена динамическая модель ФМН-зависимого фолдинга лидерной мРНК гена *uraA*, показывающая комбинативное действие рибопереключателю на уровне транскрипции и трансляции.

На модели гена *ribB* *E.coli* был показан новый механизм регуляции с участием рибопереключателю, действующий на уровне Rho-зависимой терминации транскрипции. В присутствии ФМН в лидерной мРНК гена *ribB* происходит формирование структуры, обеспечивающей связывание фактора Rho, что приводит к подавлению дальнейшей транскрипции структурной части гена в результате Rho-зависимой терминации. Полученные в этом разделе диссертации данные расширяют существующие представления о роли Rho-фактора в моделировании экспрессии генов и демонстрируют оригинальную модель регуляции экспрессии, в которой рибопереключателю контролирует процесс Rho-зависимой терминации.

Хочу отметить, что в изложении экспериментальной части работы ощущается необыкновенно бережное отношение автора диссертации к доказательной базе каждого положения, выносимого на защиту. Прежде чем сделать любой из выводов, было поставлено несколько тщательно спланированных и успешно осуществленных экспериментов, а их результаты осмыслены с разных точек зрения.

Автореферат и опубликованные автором 5 печатных работ (две из которых опубликованы в российском журнале "Генетика" и одна в PNAS) достаточно полно отражают основные разделы и положения диссертации.

Несмотря на общую положительную оценку работы, необходимо сделать некоторые замечания, которые в большинстве своем носят рекомендательный характер.

В разделе 4.2, посвященном оценке силы промоторов *rib*-оперона с помощью изучения экспрессии транскрипционных слияний с геном *lacZ*, для лучшего понимания результатов хорошо было бы указать локализацию клонированных в вектор pDG268 фрагментов на карте оперона, например, обозначив позицию праймеров, использованных для получения соответствующих конструкций, на рисунке 15.

Названия генов *uraA* и *ribGBAH*, приведенные в диссертации по старой номенклатуре, корректнее было дать в соответствии с современной базой данных NCBI (National Collection of Biological Information), где они имеют названия *fmnP* и *ribDEAH*, соответственно. Используемое в тексте диссертации и автореферата сокращение ФМН, необходимо было расшифровать.

