

Отзыв на автореферат диссертации  
Петушкива Ивана Владимировича  
“РОЛЬ СПЕЦИФИЧЕСКИХ КОНТАКТОВ  
РНК-ПОЛИМЕРАЗЫ *ESCHERICHIA COLI* С ДНК В  
ФОРМИРОВАНИИ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ПАУЗ ”,  
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.01.03 - молекулярная биология

Транскрипционные паузы важны для процессов регуляции транскрипции, трансляции, и репарации ДНК, происходящих в бактериальной клетке. Однако, молекулярные механизмы узнавания их сигналов недостаточно изучены. Мало известно о структуре транскрипционного комплекса в состоянии паузы и об особенностях контактов ДНК-зависимых РНК-полимераз (РНКП) с нуклеиновыми кислотами в таком комплексе. Поэтому тема диссертационной работы Петушкива Ивана Владимировича, посвященная изучению механизмов узнавания сигналов пауз за счёт контактов кор-фермента и альтернативных σ-субъединиц с ДНК, а также выяснению регуляторной роли таких пауз в бактериальной транскрипции, фундаментальна и актуальна.

В автореферате Петушкива И.В. четко сформулированы цели и задачи научного исследования. Для выполнения своей диссертационной работы И.В. Петушкив использовал современные методы молекулярной биологии, биохимии, генетики и микробиологии.

В результате тщательно проведенного исследования И.В. Петушкив впервые показал, что мутации в CRE-кармане РНКП *Escherichia coli* влияют на все стадии транскрипции: снижают стабильность промоторных комплексов, изменяют скорость элонгации и эффективность терминации. В работе биохимическими методами продемонстрировано связывание гуанина в +2 положении промоторного комплекса с CRE-карманом РНКП, которое стабилизирует промоторный комплекс. Диссертант выявил способность σ38 субъединицы вызывать паузы транскрипции в элонгационных комплексах, содержащих -10-подобный элемент, в системе *in vitro*. В диссертационной работе И.В. Петушкива открыт и изучен новый вид транскрипционных пауз, вызванных альтернативной σ38 -субъединицей *E. coli*, и предложен возможный механизм регуляции экспрессии генов при её участии.

Петушкив И.В. выполнил серьезное научное исследование с применением современных методов молекулярной биологии и получил важные научные результаты, опубликованные в трех статьях в международных рецензируемых научных журналах и в

13 тезисах сборников трудов международных и всероссийских конференций. Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы И.В. Петушкива не вызывает сомнений.

Полученные в работе экспериментальные данные являются оригинальными, имеют приоритетный характер и вносят существенный вклад в решение фундаментальных задач, связанных с исследованием бактериальных систем транскрипции.

Впечатление от авторефера работы И.В. Петушкива остается очень хорошим. Автореферат представляет все разделы диссертации в достаточно компактной и емкой форме, снабжен удачными рисунками, схемами, таблицами, которые облегчают восприятие представленного экспериментального материала. Считаю, что диссертационная работа заслуживает высокой оценки, а диссертант Иван Владимирович Петушкив присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология.

Кокшарова Ольга Алексеевна  
Ведущий научный сотрудник  
НИИ физ.-хим.биологии имени А.Н. Белозерского  
МГУ имени М.В. Ломоносова  
доктор биологических наук

Адрес организации:  
Федеральное государственное  
бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Московский государственный  
университет имени М.В.Ломоносова»,  
119992, Москва, Ленинские горы,  
дом 1, стр. 40  
тел. 8-495-939-31-62  
e-mail: koksharova@genebee.msu.ru



## ОТЗЫВ НА АВТОРЕФЕРАТ

Диссертации Петушкива Ивана Владимировича  
«Роль специфических контактов РНК-полимеразы *Escherichia coli* с ДНК в  
формировании транскрипционных пауз» представленной на соискание ученой  
степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная  
биология

РНК полимераза бактерии *E. coli* является модельным объектом для исследования молекулярных механизмов транскрипции. Диссертационная работа И.В. Петушкива посвящена изучению роли контактов CRE-кармана РНК-полимеразы *E. coli* с нематричной цепью ДНК в образовании транскрипционных пауз и исследованию влияния альтернативных сигма субъединиц на формирование транскрипционных пауз. Для достижения поставленной цели были использованы современные молекулярно-биологические методы, позволяющие решить поставленные в работе задачи. В частности, в работе был получен набор генных конструкций, содержащих промоторы альтернативной сигма-субъединицы, мутантные варианты РНК-полимеразы, для исследования структур комплексов использовались методы футпринтинга и еще целый ряд молекулярных подходов.

В работе И.В. Петушкива было показано, что мутации в CRE-кармане РНК-полимеразы влияют на транскрипцию в целом и приводят к увеличению транскрипционной паузы за счет изменений во взаимодействии РНКП *E. coli* с нематричной цепью ДНК. Учитывая то, что РНК-полимеразы бактерий и эукариот достаточно консервативны, описанные в работе молекулярные механизмы могут действовать и в случае РНК-полимераз других организмов. Полученные в работе данные имеют также важное прикладное значение, в частности, для разработки новых лекарственных средств. Некоторые антибиотики ингибируют РНК-полимеразу, тем самым подавляется рост бактерий. Одним из таких антибиотиков является рифампицин. В работе были выявлены новые мутации, влияющие на устойчивость бактерий к этому антибиотику. Полученные данные могут служить основой для дальнейшего поиска новых ингибиторов РНК-полимеразы.

Сделанные в работе выводы обоснованы и логично вытекают из результатов исследования. Полученные результаты опубликованы в высокорейтинговых зарубежных журналах Nucleic Acids Research и RNA Biology, а также представлены на международных и российских конференциях, что свидетельствует об их высокой значимости.

На основании вышеизложенного считаю, что диссертационная работа соответствует требованиям, установленным в Положении о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а автор работы Петушкив Иван Владимирович заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Доктор биологических наук,  
заведующий Лабораторией «Геномики  
микроорганизмов и метагеномики»  
ФИЦ Биотехнологии РАН

А.В. Марданов



А.В. Марданов  
ПРИЕМЕРЯЕТСЯ  
2017

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Петушкива Ивана Владимировича «Роль специфических контактов РНК-полимеразы *Escherichia coli* с ДНК в формировании транскрипционных пауз», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - «Молекулярная биология».

Представленная работа посвящена изучению структуры транскрипционного комплекса в состоянии паузы. Актуальность и научная значимость данного исследования не вызывает сомнения, т.к. транскрипционные паузы оказывают влияние на различные стадии экспрессии генов, в том числе транскрипцию, трансляцию, а также репликацию и репарацию ДНК. Однако до настоящего времени о молекулярных механизмах узнавания транскрипционных пауз было известно крайне мало, что ограничивало наше понимание осуществляющей ими регуляции экспрессии генов.

Одной из задач данной работы явилось изучение контактов CRE-кармана РНК-полимеразы *Escherichia coli* с ДНК в состоянии паузы транскрипции. С использованием грамотного мутационного подхода, автором показано, что нарушение взаимодействия CRE-кармана РНК-полимеразы *Escherichia coli* с нематричной цепью ДНК приводит к снижению стабильности промоторных комплексов, а также влияет на скорость элонгации и эффективность терминации транскрипции. Также И.В. Петушкив исследовал контакты CRE-кармана РНК-полимеразы *Escherichia coli* с остатком гуанина в +1 положении нематричной цепи ДНК. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что исследуемые взаимодействия усиливают формирование транскрипционных пауз.

В рамках исследования  $\sigma^{38}$ -зависимой транскрипции, автором установлено, что  $\sigma^{38}$ -субъединица вызывает паузы на стадии элонгации транскрипции, переводя транскрипционный комплекс в смещенное состояние. Кроме этого, И.В. Петушкив показал, что  $\sigma^{38}$ -субъединица способна вызывать промотор-проксимальные паузы, оставаясь связанной с элонгационным комплексом.

Несомненно, полученные результаты имеют существенное значение для понимания молекулярных механизмов узнавания транскрипционных пауз, хотя, например, механизм влияния сигналов  $\sigma^{38}$ -зависимых пауз остается неизвестным и, по-видимому, станет одной из целей дальнейших исследований.

Суммируя, работа И.В. Петушкива представляет собой многоэтапное исследование, выполнена на высоком научном уровне с использованием современных молекулярно-биологических и молекулярно-генетических методов. Результаты этой фундаментальной работы опубликованы в высокорейтинговых международных рецензируемых биологических изданиях, а также представлены на международных конференциях. По своей актуальности, новизне, практической значимости работа соответствует требованиям п. 7 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановления правительства РФ от 30.01.2002г №74) в редакции Постановления правительства РФ от 20 июня 2011 года №475, представляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - «Молекулярная биология».

Научный сотрудник  
Сколковский институт науки и технологий  
кандидат биологических наук

  
/Климук Е.И./

Подпись Е.И. Климuka заверяю:

РУКОВОДИТЕЛЬ ОТДЕЛА  
КАДРОВОГО АДМИНИСТРИРОВАНИЯ  
БУРДЕНКО Н.Г.



## **Отзыв**

на автореферат диссертации Петушкива Ивана Владимировича  
«Роль специфических контактов РНК-полимеразы *Escherichia coli* с ДНК  
в формировании транскрипционных пауз»,  
представленной к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по  
специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Ключевую роль в жизнедеятельности клетки играет процесс транскрипции, который обеспечивает передачу генетической информации РНК-посреднику, в свою очередь являющемуся матрицей для синтеза белка. Контроль за эффективностью транскрипции генов осуществляется на разных уровнях. Традиционно считается, что решающее значение в этом процессе играют факторы белковой природы. Однако в последнее время становится очевидным наличие разнообразных еще малоизученных этапов регуляции транскрипции, например, роль в ней транскрипционных пауз – остановок в функционировании многосубъединичных ДНК-зависимых РНК-полимераз (РНКП).

Главным направлением работы Петушкива И.В. явилось изучение механизмов узнавания сигналов пауз за счёт контактов кор-фермента (а именно, его CRE-кармана) и альтернативных σ-субъединиц с ДНК. Для решения поставленных целей и задач автор использовал набор мутантных форм РНКП *E. coli* с аминокислотными заменами и делециями в CRE-кармане, а также фрагменты ДНК с нуклеотидными заменами в значимых участках и модельные системы, имитирующие различные стадии транскрипции. В целом, проведенные исследования показали, что CRE-карман играет важную роль на всех стадиях транскрипции, а нарушения его первичной структуры значительно изменяют эффективность узнавания регуляторных сигналов пауз и терминации транскрипции. Открыт и изучен новый вид транскрипционных пауз, вызванных σ<sup>38</sup>-субъединицей *E. coli*, альтернативной σ<sup>70</sup>-субъединице, и предложен возможный механизм регуляции экспрессии генов при её участии.

Из изложенного в автореферате материала осталось непонятным, характеризовали ли авторы мутантные формы РНКП в стандартной реакции транскрипции для того, чтобы убедится, что «испорченные» белки сохраняют свою ферментативную активность. Возможно, это информация присутствует в тексте диссертации. Раздел на странице 22 должен иметь номер 8, а не 7.

Указанные замечания нисколько не снижают качества данной диссертационной работы. Полученные автором результаты имеют фундаментальное значение, и, несомненно, представляют большой научный интерес. Об этом свидетельствуют три статьи, опубликованные Петушковым И.В. по теме работы в престижных международных журналах, а также представление результатов на многих международных конференциях.

Работа Петушкива И.В. имеет и практическое значение, так как в ходе ее выполнения автором выявлены ранее не охарактеризованные мутации в гене РНКП, которые придают устойчивость бактериям к антибиотику рифампицину, широко применяемому в клинической практике.

Автореферат написан безукоризненно как с точки зрения логики изложения материала, так и с точки зрения оформления.

Диссертационная работа Петушкива И.В. «Роль специфических контактов РНК-полимеразы *Escherichia coli* с ДНК в формировании транскрипционных пауз» полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, изложенным в пункте 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней» № 842 от 24 сентября 2013 г., а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Главный научный сотрудник отдела химии нуклеиновых кислот  
Научно-исследовательского института физико-химической биологии  
имени А.Н. Белозерского Федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения высшего  
профессионального образования «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова»,  
доктор химических наук, профессор

Е.А. Кубарева

15.11.2017

119991, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, строение 40  
тел.: +7(495)939-54-11, e-mail: kubareva@belozersky.msu.ru

