

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Комаровой Екатерины Сергеевны
на тему: «Изучение особенностей 5'-нетранслируемой области
бактериальных мРНК, влияющих на эффективность трансляции,
с помощью библиотек репортёрных конструкций»
по специальности 1.5.3. Молекулярная биология**

Изучение принципов работы трансляционного аппарата у бактерий является предметом многих исследований, направленных на оптимизацию биосинтеза белка в биотехнологических процессах. Из классических исследований известно о ключевых цис-регуляторных элементах трансляции. Они представлены стартовым кодоном, последовательностью Шайна-Дальгарно, разнообразными энхансерными элементами, а также вторичной структурой РНК. Однако наличие и взаимное расположение этих цис-регуляторных элементов не объясняет всего многообразия наблюдаемых уровней эффективности трансляции и, как следствие, уровней экспрессии белка. Прогресс, достигнутый в развитии методов секвенирования, открывает новые возможности для изучения многих клеточных процессов, включая оценку эффективности трансляции большого числа мРНК. Поэтому описание особенностей 5'-нетранслируемой области бактериальных мРНК, влияющих на эффективность трансляции, и разработка высокопроизводительных методов оценки эффективности трансляции являются актуальными задачами современной молекулярной биологии.

В диссертационной работе Комаровой Е.С. описывается адаптированный метод Flow-seq, основанный на использовании библиотек репортерных конструкций, в которых перед геном флуоресцентного белка помещаются различные синтетические и природные 5'-нетранслируемые области. Библиотеки репортерных конструкций, в которых 5'-нетранслируемые области представлены во многих тысячах вариантов, дают возможность оценить зависимость уровня экспрессии генов флуоресцентных

репортерных белков от последовательности 5'-нетранслируемой области с помощью комбинации проточной цитометрии и высокопроизводительного секвенирования. Полученные результаты анализируются и сравниваются с результатами других работ с применением иных методов. Также полученные результаты используются для поиска новых эффективных сайтов посадки рибосомы и определения основных свойств таких сайтов, обуславливающих высокий уровень биосинтеза белка.

Диссертация изложена на 177 страницах и содержит все необходимые разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Материалы и методы», а также «Список литературы». В обзоре литературы автор досконально описывает роль 5'-нетранслируемой области в эффективности трансляции в бактериальных клетках и подходы к ее изучению, в частности метод Flow-seq. В разделе «Результаты и их обсуждение» приводится схема создания библиотеки плазмид с фрагментом рандомизации, описание клонирования полученной библиотеки плазмидных ДНК, валидация метода Flow-seq, и описание применения метода Flow-seq для разделения клеток *E. coli* с разными репортёрными конструкциями и последующего анализа их последовательностей. Показано, что метод Flow-seq успешно адаптирован для высокопроизводительного определения эффективности трансляции синтетических и природных 5'-нетранслируемых областей. Затем производится изучение влияния рандомизированных 5'-нетранслируемых областей на эффективность трансляции. Показано, что высокая эффективность трансляции некоторых мРНК не может быть объяснена только последовательностью Шайна-Дальгарно, наличием или отсутствием AU-богатого энхансера на 5'-конце мРНК, или отсутствием ингибирующего влияния вторичной структуры мРНК. Из наблюдаемых закономерностей делается вывод о том, что эффективность трансляции уменьшается с увеличением доли остатков цитозина в последовательности 5'-нетранслируемой области, дополнительные старт-кодоны и

последовательности Шайна-Дальгарно аддитивно влияют на эффективность трансляции, а наличие AG-повторов в 5'-нетранслируемой области положительно влияет на эффективность трансляции. Обсуждаются природные 5'-нетранслируемые области *E. coli* перед геном *ser* с высокой эффективностью трансляции, производится оценка влияния вторичной структуры и состава природных 5'-нетранслируемых областей на эффективность трансляции, производится сравнение результатов, полученных с помощью методов Flow-seq и Ribo-seq. Из анализа природных 5'-нетранслируемых областей *E. coli* следует, что мРНК с природными 5'-нетранслируемыми областями менее вариабельны по эффективности трансляции, чем рандомизированные последовательности, а также что в более длинных 5'-нетранслируемых областях чаще встречаются благоприятные для трансляции варианты из случайных последовательностей, чем в более коротких. Таким образом, положения, выносимые на защиту, представляются хорошо обоснованными. Они обсуждаются в разделе «Заключение» и еще раз перечисляются в разделе «Выводы». Раздел «Материалы и методы» содержит техническую информацию о произведенных экспериментах, последовательности праймеров, а также биоинформатические протоколы и пр. Список литературы содержит 261 цитирование. Представленные в диссертации результаты являются новыми, а их достоверность подтверждается публикациями в рецензируемых международных и отечественных журналах с индексированием в базах данных Web of Science и Scopus, в которых автор внесла существенный вклад.

При чтении диссертационной работы у меня возникли следующие замечания:

1. На стр. 101 в разделе 2.4. «Оценка влияния особенностей рандомизированных 5'-UTR на эффективность трансляции» приводится нетривиальное наблюдение о неравномерности нуклеотидного состава в позициях от -13 до -7 и утверждается, что оно скорее всего отражает выборку из SD-подобных последовательностей, что будет рассмотрено далее. Однако

где именно далее это обсуждается — не понятно. Было бы удобнее сделать ссылку на раздел.

2. На стр. 150 в разделе 2.3.2.3. «Оценка стабильности вторичной структуры мРНК» сообщается, что для оценки статистической значимости различий в свободной энергии Гиббса были сгенерированы наборы перемешанных последовательностей, полученных путём случайной перестановки нуклеотидов. Функция Гиббса складывается из аддитивных вкладов энергии стекинга, которые зависят от динуклеотидного состава, что следует учитывать в процедуре перемешивания.

3. Экспериментальная часть работы выполнена с использованием конструкций, содержащих кодирующие области генов *cer* и *rfp*. Остается непонятным то, до какой степени результаты работы зависят от нуклеотидных последовательностей именно этих генов, а также можно ли распространить их на трансляцию других генов. Совершенно понятно, что провести эксперименты со всеми генами *E. coli* невозможно, однако эта деталь работы заслуживает как минимум обсуждения.

Тем не менее, диссертация написана прекрасным языком, логично организована и прекрасно проиллюстрирована. Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.3. Молекулярная биология (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель **Комарова Екатерина Сергеевна** безусловно заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

кандидат физико-математических наук,
доцент,
Центр Молекулярной и Клеточной Биологии
Автономная некоммерческая образовательная
организация высшего образования
«Сколковский институт науки и технологий»

Первушин Дмитрий Давидович

07 ноября 2023 г.

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

01.01.06 Математическая логика, алгебра и теория чисел

Адрес места работы:

121205, г. Москва, Территория Инновационного Центра “Сколково”,
Большой бульвар д.30, стр.1, Центр Молекулярной и Клеточной Биологии