

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

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ. Эффективность белкового синтеза у бактерий в большой степени зависит от особенностей структуры 5'-нетранслируемых областей (5'-НТО) их мРНК. При этом большое генетическое разнообразие бактерий также находит своё отражение в различных вариациях механизма инициации трансляции у различных представителей этого царства живых организмов. Однако до сих пор в фундаментальной науке отсутствует комплексное понимание того, каким образом различные элементы структуры 5'-НТО определяют эффективность трансляции. Вместе с тем такие знания крайне необходимы и для задач биотехнологии, когда важно уметь настраивать определённые уровни биосинтеза целевых белков. В этой связи тема диссертационной работы Комаровой Е.С., связанная с изучением влияния особенностей 5'-НТО бактериальных мРНК на эффективность трансляции, является несомненно актуальной.

Научная новизна исследования состоит в применении комбинаторного подхода для решения поставленных задач, что впервые позволило провести подробный анализ *in vivo* для более 24,5 тысяч различных последовательностей в 5'-НТО бактериальных мРНК, представленных как синтетическими, так и природными вариантами. Такое разнообразие мРНК позволило обеспечить изменение эффективности трансляции в пределах четырёх порядков между самым высоким и самым низким уровнем синтезированного белка, а применение в работе современного метода Flow-seq дало возможность получить достоверные и значимые результаты. На

основании материала, представленного в диссертации, следует заключить, что положения, выносимые на защиту вполне обоснованы.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ. Диссертация изложена на 177 страницах и содержит 73 рисунка и 9 таблиц, также в три приложения к диссертации включены данные в виде 5 таблиц. Работа написана по традиционной схеме и содержит следующие основные разделы: “Введение”, “Обзор литературы”, “Результаты и обсуждение”, “Заключение”, “Выводы”, “Материалы и методы” и “Список литературы”. Список цитируемой литературы включает 261 источник.

КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНОГО СОДЕРЖАНИЯ ДИССЕРТАЦИИ. В главе “Введение” в кратком виде изложены актуальность работы, цель и задачи исследования, означены предмет и объект исследования, раскрыта научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, а также указана методология, использованная в диссертационном исследовании. Здесь же даны положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов, и приведена информация об апробации работы, количестве публикаций по материалам диссертации и личном вкладе автора.

Глава “Обзор литературы” состоит из двух разделов. Первый раздел озаглавлен как “Роль 5'-нетранслируемой области в эффективности трансляции в бактериальных клетках”, однако содержащаяся в нём информация охватывает существенно больший пласт научных знаний. Здесь в краткой форме содержатся и понятие о генетическом коде, и описание строения бактериальной рибосомы, и представление о структуре мРНК, и описание механизма трансляции у бактерий, включая описание ингибиторов различных стадий трансляции. Детально механизм стадии инициации трансляции описывается в отдельном подразделе, следующим за разделом “Разнообразие 5'-UTR у бактерий”, в котором собрана информация в основном о последовательности Шайна-Дальгарно. Во втором разделе данной главы

дано подробное описание множества подходов, применяемых в изучении роли 5'-НТО в эффективности трансляции. Из ознакомления с этой частью работы можно заключить, что диссертант хорошо разбирается в теме своего исследования, находится в курсе современных работ по данному направлению и знаком с основами многих методов, применяемых в работах “коллег по цеху”. Использование множества качественных цветных иллюстраций в оформлении обзора даёт возможность наиболее полно воспринимать подаваемый материал. Чтение обзора, особенно учитывая то, что он написан достаточно стройно, позволяет составить самое благоприятное представление о научной эрудиции автора.

Глава “Результаты и их обсуждение” разделена на три больших подраздела, содержащих описание работы, в ходе которой автором получены основные достижения. Первая часть работы посвящена изучению влияния спейсерного участка в 5'-НТО на эффективность трансляции. Автор подробно описывает создание библиотеки плазмид, содержащих гены репортёрных флуоресцентных белков и 4-звенный рандомизованный фрагмент в участке, соответствующем спейсеру в 5'-НТО мРНК между последовательностью Шайна-Дальгарно и старт-кодоном. Далее автор проводит валидацию метода Flow-seq - основного экспериментального метода данной работы, используя клетки, трансформированные контрольной плазмидой, и проводит исследования с применением данного метода и полученной библиотеки, чтобы оценить влияние особенностей спейсерного участка на эффективность трансляции. На основании полученных результатов автором делается заключение, что использование А-богатых спейсерных последовательностей способствует эффективной трансляции содержащих их матриц, тогда как присутствие в них цитидина наоборот, снижает эффективность трансляции.

Вторая часть работы посвящена изучению влияния на эффективность трансляции более протяжённых последовательностей в 5'-НТО. В данном

случае автор использует подход, аналогичный применённому в первой части работы, но область рандомизированных нуклеотидов составляет уже 20 или 30 нт. Это позволило значительно расширить число различных вариантов последовательности 5'-НТО и провести более детальное сканирование участков на значительном удалении от старт-кодона. Снова применяя метод Flow-seq, автор выявляет отклонения в нуклеотидном составе эффективно транслируемых вариантов мРНК и показывает заметное обогащение основаниями А и G в позициях от -13 до -7 относительно стартового кодона в высоко эффективных 5'-НТО, а также демонстрирует множество других эффектов. Детальный анализ полученной информации позволил автору сделать ряд важных заключений о предпочтительных особенностях структуры 5'-НТО, влияющих на эффективность трансляции мРНК. Важно отметить, что автор не просто перечисляет обнаруженные эффекты, а даёт им логичную трактовку и сравнивает с результатами работ других исследователей.

Третья часть работы описывает изыскания автора по изучению влияния природных 5'-НТО на эффективность трансляции. На этот раз автор создаёт библиотеку репортёрных конструкций, содержащих перед старт-кодоном 713 отобранных 5'-НТО длиной от 2 до 60 нт и вновь использует метод Flow-seq для поиска наиболее оптимальных для трансляции последовательностей. Всесторонний анализ полученных результатов позволил установить, что природные 5'-НТО, как правило, обеспечивают умеренную трансляцию мРНК и не обладают сложной вторичной структурой, более эффективные 5'-НТО имеют в составе последовательность Шайна-Дальгарно независимо от расстояния до старт-кодона и обогащены остатками аденозина. Интересно, что полученные данные в целом согласуются с ранними данными, полученными методом Ribo-seq, что дополнительно указывает на высокую достоверность результатов, полученных с использованием метода Flow-seq.

В итоге, продемонстрировав отличное владение техникой эксперимента и грамотный подход к анализу данных, автору удалось блестяще справиться с поставленными задачами, сделать несколько оригинальных находок, на основании которых сформулировано 6 обоснованных умозаключений, изложенных в разделе “Выводы”. Сами выводы лаконичны, конкретны, достоверны и подкреплены материалами, представленными в диссертации.

Глава “Материалы и Методы” диссертации содержит исчерпывающее и подробное описание всех экспериментальных процедур, использованных автором в своих исследованиях. Также здесь приведены списки использованных реактивов и оборудования, состав буферных растворов и сред, даны характеристики использованных бактериальных штаммов и генетических конструкций, и указаны последовательности олигонуклеотидов. Приведенной информации вполне достаточно для воспроизведения экспериментов.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ. Диссертационная работа Комаровой Екатерины Сергеевны выполнена на высочайшем научном уровне. Список работ по теме диссертации включает 4 статьи в высокорейтинговых журналах, что свидетельствует о международном признании трудов автора научным сообществом. Тем не менее, у оппонента имеется ряд замечаний по тексту диссертации. Несколько замечаний связаны с подачей материала. Так, в главе “Обзор литературы” большое внимание уделено рассмотрению вопросов общеобразовательного характера, которые имеют слабое отношение к теме диссертации. К ним, например, можно отнести информацию о физических параметрах рибосомы (стр. 18), структуре тРНК и модифицированных остатках в её составе (стр. 19-21), а также этапах действия антибиотиков – ингибиторов трансляции (стр. 21). Подписи некоторых рисунков не совсем соответствуют тому, что на них изображено, например, на рис. 20 нет стереоизображения, а на рис. 18 нет цветных рамок. В ряде случаев встречаются неуместные/неправильные англицизмы (напр.,

“чекпоинт” (стр.41) – чекпойнт или контрольная точка), неправильная терминология (напр., “редкие кодоны чаще встречаются на N-конце природных генов” (стр. 71) – у генов всё-таки нет N-концов), а также неправильные трактовки (напр., “Ribo-seq используют для изучения скорости декодирования рибосом” (стр. 60) – декодируется всё-таки мРНК, а метод используют для изучения эффективности трансляции). В главе “Результаты” много внимания уделено подробностям создания генетических конструкций (напр., даны температура и время отжига праймеров, температура и время инкубации клеток и т.д.), что, по идее, должно находиться в разделе “Материалы и методы”. Также следует упомянуть, что раздел 4 главы “Результаты” больше похож на заключение по материалам работы, и эту часть следовало бы отнести соответственно в раздел “Заключение”, который напротив, содержит элементы “Введения”.

Непосредственно по работе имеется один вопрос. Так, на стр. 98, где приводится обоснование используемого комбинаторного подхода автор пишет, что оценка количества полученных клеток после электропорации с помощью титрования показала 10^6 - 10^7 различных вариантов, лишь частично покрывающих размер возможных библиотек $20N$ и $30N$. При этом далее им утверждается, что достигнутый на этом этапе результат можно считать значимым, так как полученное разнообразие вариантов на 3-4 порядка превышает число 5'-UTR природных генов. На самом деле не понятно, почему для обоснования значимости результата приводится сравнение числа синтетических и природных последовательностей, тогда как кажется разумным сравнивать число полученных вариантов синтетических последовательностей с их максимально возможным числом (4^{20} и 4^{30})?

Вместе с тем, 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 заслуживает присуждения ученой степени кандидат химических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Доктор химических наук, доцент
Заведующий лабораторией структуры и функции рибосом ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук»

Малыгин Алексей Аркадьевич

13.11.2023 г.

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.01.04 – биохимия

Адрес места работы:

630090, г. Новосибирск, пр. ак. Лаврентьева, д. 8,
ИХБФМ СО РАН, Лаборатория структуры и функции рибосом