

**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 диссертационного исследования**

Биосинтез белка – один из важнейших этапов реализации генетической программы любого организма. Но кроме того, биосинтез белка, в частности в бактериальных клетках – это и мощный биотехнологический инструмент. Поэтому исследование фундаментальных основ и совершенствование методов экспрессии генов в бактериальных системах является весьма актуальной задачей. С этой точки зрения диссертационная работа Екатерины Сергеевны Комаровой является безусловно актуальной, поскольку посвящена поиску принципов повышения и регуляции эффективности трансляции за счет 5' нетранслируемой области мРНК. Особо стоит отметить, что этот поиск является широкомасштабным, поскольку произведен с помощью современного метода Flow-seq на библиотеках из нескольких тысяч репортёрных конструкций.

**Структура работы**

Материал диссертации изложен на 177 страницах машинописного текста, который включает в себя 72 рисунка и 8 таблиц. Диссертационная работа написана в соответствии с требованиями к оформлению работ и состоит из разделов: «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Материалы и методы» (содержит дополнительный рисунок и таблицу) и «Список литературы», который содержит 261 ссылку. Также в работу включены 3 приложения с 5 дополнительными таблицами.

## **Научная новизна и практическая значимость работы**

В диссертационной работе Екатерины Сергеевны Комаровой впервые проводится подробный анализ эффективности трансляции более 24,5 тысяч различных репортёрных мРНК с 5'-нетранслируемыми областями бактериальных мРНК, представленных как синтетическими, так и природными вариантами. Такое разнообразие было достигнуто за счет применения современного метода Flow-seq. В работе Екатерины Сергеевны были обозначены несколько различных особенностей, свойственных набору вариантов последовательностей 5'-UTR, наиболее эффективных в трансляции. Помимо уже известных детерминант найдено несколько ранее не описанных особенностей, способствующих увеличению эффективности трансляции: низкая доля остатков цитидина, AG-повторы и множественные последовательности SD. Кроме того, было выявлено отрицательное влияние на инициацию трансляции маскировки сайта связывания рибосомы за счёт образования вторичной структуры мРНК, известное и прежде. Полученные результаты могут служить рекомендациями по выбору последовательностей 5'-НТО для бактериальных систем экспрессии.

## **Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов**

Положения, сформулированные в диссертации Комаровой Екатерины Сергеевны, основаны на большом объеме фактического материала. Выводы обоснованы совокупностью приведенных данных. Статистическая обработка экспериментальных данных адекватна, их достоверность не вызывает сомнений.

## **Оценка содержания диссертационной работы и ее завершенности**

Диссертационная работа Екатерины Сергеевны Комаровой по своей структуре и качеству изложения материала соответствует имеющимся стандартам. Во «Введении» автор формулирует цели и задачи работы. Здесь же обосновывается ее актуальность, теоретическая и практическая значимость. Обзор литературы посвящен роли 5' НТО в инициации трансляции прокариотических мРНК, а также описанию экспериментальных подходов для

изучения этой роли. Иллюстративный материал в немалой степени способствует пониманию описываемого материала. Язык изложения довольно прост и понятен. Стоит отметить малое количество опечаток и ошибок в тексте этой части работы, что, впрочем, относится и ко всему тексту в целом.

Раздел «Материалы и методы» содержит подробное описание примененных автором методик, которые полностью соответствует поставленным экспериментальным задачам. Стоит отметить, что подробное описание некоторых этапов получения библиотек мРНК с различными 5' НТО приводится и в разделе «Результаты и обсуждение».

В разделе «Результаты и обсуждение» автор представляет полученные данные и сопровождает их достаточно развернутым анализом. Необходимо отметить четко продуманную стратегию исследования, большой объем экспериментов (в том числе экспериментов по валидации данных), а также несомненное мастерство автора при их выполнении. В разделе «Заключение» диссертант коротко суммирует полученную информацию и подводит итоги исследования. Раздел «Выводы» содержит 6 утверждений, все из которых серьезных нареканий не вызывают.

В целом после прочтения рукописи не остается сомнений в научной значимости диссертационной работы, а также в ее потенциальной пользе для будущих фундаментальных и прикладных исследований.

### **Соответствие автореферата основным положениям диссертации**

Автореферат диссертационной работы оформлен по стандартной схеме и соответствует установленным требованиям, материал автореферата точно и достоверно отражает результаты проведенных исследований, дает исчерпывающее представление о содержании диссертации и степени участия автора в исследованиях.

### **Замечания и комментарии к диссертационной работе**

Серьезных замечаний к работе Екатерины Сергеевны Комаровой нет. Это безусловно прорывная работа, демонстрирующая возможности метода Flow-Seq для широкомасштабного изучения трансляции в прокариотических клетках.

Однако есть несколько комментариев и небольших замечаний, которые, надеюсь, будут полезны автору диссертации.

1. Комментарий относится не только к разделу «Обзор литературы», но и к тексту диссертации в целом. Можно отметить некоторый разброс в стиле изложения. Некоторые главы написаны строгим научным языком, другие научно-популярным или носят справочный характер. При этом некоторая информация частично повторяется несколько раз. Это касается описания трансляции в целом (рисунки 8 и 24), а также некоторых фактов об энхансерных элементах в 5'НТО. Так, только в обзоре литературы можно четырежды прочитать о том, что AU-богатая область в 5' НТО служит сайтом связывания рибосомы, взаимодействуя с белком малой субчастицы bS1. Кроме того, иногда автор в рисунках и подписях к ним дает дополнительную информацию, которая не касается того что описывается в тексте. Например, на рисунке 8 и подписи к нему приводится информация об антибиотиках, ингибирующих разные стадии трансляции, но для чего эта информация нужна не вполне ясно.

Следует отметить и желание автора объяснить простым языком то, что, на мой взгляд, можно и не объяснять. Яркий пример подпись к некоторым рисункам в разделе результаты: «Распределение множества значений ... представлено в виде «ящика с усами», известного в статистике», «диапазоны квартилей показаны в виде «ящика» (от 25% до 75%) и тонких линий, известных как «усы».

2. Эффективность трансляции, которая измеряется по флюоресценции продукта трансляции мРНК, определяется эффективностью взаимодействия мРНК с 30S субчастицей и дальнейшими этапами инициации трансляции, а также количеством мРНК в клетке. Конечно, автор исходит из предположения, что количество мРНК в прокариотической клетке, синтезируемых с репортёрных конструкций, одинаково в силу идентичности промоторных областей этих конструкций. Однако строго говоря, в своих экспериментах автор не может

исключить влияния 5'НТО на стабильность мРНК, а следовательно на её количество. В пользу этого предположения свидетельствует, например, статья Chen et al. «5'UTR sequences influence protein levels in Escherichia coli by regulating translation initiation and mRNA stability» (<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1088941>). Возможно, сопоставление эффективности синтеза флюоресцентного белка с количеством мРНК, с которой он синтезируется, несколько изменит распределение по фракциям. Кроме того, возможно, что влияние 5'НТО на количество мРНК объясняет не совсем полное совпадение результатов Flow-Seq с данными Ribo-Seq (в котором учитывается количество РНК), продемонстрированное на рисунках 71 и 72.

3. Было бы интересно проанализировать полученные данные на предмет наличия в «эффективных» 5' НТО сайтов связывания РНК-связывающих белков, которые потенциально могли бы помогать привлекать 30S рибосомную субчастицу к мРНК, как, например, белок bS1, который взаимодействует с AU-богатыми областями мРНК и одновременно с рибосомной субчастицей. Это, возможно, помогло бы определить новые детерминанты эффективности трансляции в 5' НТО мРНК.
4. Нельзя ли, по мнению автора, использовать данные Flow-Seq, полученные для синтетических последовательностей, для предсказания эффективности трансляции природных мРНК из других бактерий, в том числе и тех, для которых характерна малая доля мРНК с последовательностью Шайна-Дальгарно.
5. Вопрос на размышление. Будет ли, по мнению автора, картина распределения мРНК с синтетическими 5' НТО по фракциям эффективности трансляции одинакова для разных видов бактерий (имеются в виду эволюционно далекие друг от друга).
6. Бросается в глаза, что значения относительной эффективности трансляции, приведенные в таблицах 4-8 раздела «Результаты и обсуждение» указаны без доверительного интервала, не ясно является ли приведенное значение средним

нескольких (скольких?) экспериментов. Уверен, что статистическая обработка данных, особенно данных полученных их экспериментов Flow-Seq, проводилась, но по каким-то причинам не приводится в работе.

7. Небольшие замечания к выводам. В выводе 1 написано «... для определения эффективности трансляции синтетических и природных 5'-нетранслируемых областей...», что является неверной формулировкой. Вероятно, имелось в виду «определения эффективности трансляции **репортерных мРНК** с синтетическими и природными 5'-нетранслируемыми областями...». Второе предложение вывода 6, на мой взгляд, является априори очевидным с точки зрения статистики и не нуждается в презентации как вывод.
8. На мой взгляд, сокращение 5'UTR, используемое в работе, имеет устоявшийся аналог в русском языке – 5' НТО (**нетранслируемая область**), использование которого было бы вполне уместным.

Перечисленные замечания к диссертационной работе Екатерины Сергеевны Комаровой ни в коем случае не умаляют её научную значимость, поскольку замечания в большинстве своем носят характер комментариев, диктуются желанием оппонента узнать еще больше о предмете исследования и его перспективах.

### **Заключение**

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.3. Молекулярная биология, 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 Екатерина Сергеевна Комарова заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на межлабораторном семинаре группы регуляции биосинтеза белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, руководитель

группы регуляции биосинтеза белка

Федерального государственного

бюджетного учреждения науки Институт

белка Российской академии наук

Лябин Дмитрий Николаевич

21 ноября 2023 г.

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:

1.5.3 – Молекулярная биология

Адрес места работы:

142290, Московская обл. г.Пушино, ул. Институтская, д. 4,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка

Российской академии наук, группа регуляции биосинтеза белка

Подпись сотрудника ИБ РАН

Лябина Дмитрия Николаевича

удостоверяю: