

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Евсютиной Дарьи Викторовны
на тему: «Регуляция передачи генетической информации у бактерий
с редуцированным геномом»
по специальности 1.5.3 (03.01.03)– «Молекулярная биология»

Диссертационная работа Евсютиной Д.В. посвящена изучению механизмов регуляции экспрессии генов у бактерий с редуцированным геномом, на примере *Mycoplasma gallisepticum* S6. Более глубокое исследование регуляторных механизмов у бактерий, особенно тех, которые имеют малое число генов и при этом широко распространены и легко адаптируются к новым условиям, может открыть новый регуляторный слой и служить ключевым фундаментальным шагом при создании клеток с заданным набором функций. Более того микоплазмы – патогены многих животных, в том числе сельскохозяйственных. Антибактериальная терапия микоплазмозов ограничивается использованием макролидов и тетрациклинов, выявление новых специфических мишеней, которыми в том числе могут являться регуляторы экспрессии генов является актуальной задачей. В своей работе Евсютина Д.В. сконцентрировалась в большей степени на поиске факторов регуляции транскрипции. В работе были использованы современные молекулярно-биологические и биоинформатические методы. Научная значимость полученных результатов подтверждена публикациями в отечественных и международных журналах.

Диссертационная работа построена по традиционной схеме и включает в себя следующие разделы: список сокращений, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы и приложение. Работа изложена на 145 страницах текста, содержит 50 рисунков и 6 таблиц, библиография содержит 163 литературных источника. Обзор литературы имеет объем около 20 страниц и включает в

себя 5 разделов. В первом разделе дается приводится историческая справка об основном правиле передачи генетической информации – центральной догме молекулярной биологии. Второй и третий разделы описывают общие представления о транскрипции у прокариот и о механизмах ее регуляции. Четвертый раздел посвящен методам, как молекулярно-биологическим, так и биоинформатическим, которые используются для поиска факторов регуляции транскрипции и определения их мишеней. Наконец, в пятом разделе описаны особенности устройства аппарата транскрипции и трансляции у микоплазм, а также известные механизмы регуляции транскрипции. Построение обзора литературы в целом удачно, соответствует теме исследования и позволяет оценить новизну работы.

В разделе «Материалы и методы» описаны экспериментальные и биоинформатические подходы, использованные в работе. К основным экспериментальным методам, которые применяла Евсютина Д.В., можно отнести – выделение нуклеиновых кислот; дизайн и конструирование большого числа векторов как для наработки целевых белков в *E. coli*, так и для генетических манипуляций в микоплазмах – получения трансформантов со сверхэкспрессией генов, целенаправленного снижения экспрессии генов с помощью CRISPR-интерференции, оценки влияния элементов промоторов на экспрессию репортерного гена; количественная ОТ-ПЦР в реальном времени; электрофорез в нативных условиях и некоторые другие. Биоинформатические методы, использованные Евсютинной Д.В. – предсказание транскрипционных факторов в последовательностях белков с помощью поиска ортологов; поиск функциональных и консервативных доменов; поиск сайтов связывания транскрипционных факторов; оценка «силы» промотора. Последний метод, к слову, описан не в «Материалах и методах, а в разделе 3.6 «Поиск и валидации новых генов – мишеней регуляторов» (кстати, не стоило ли использовать термин «валидация» в единственном числе?), где он и используется. Стоит отметить, что биоинформатические методы описаны более скупой, чем экспериментальные;

как минимум, хотелось бы увидеть параметры, с которыми проводились расчёты.

Финальный раздел диссертации – глава «Результаты и обсуждение», состоит из нескольких частей. В каждой части приводятся результаты, полученные при решении поставленных ранее задач.

Так, в первой части после проведенного анализа структурных доменов белков микоплазм, Евсютиной Д.В. найдено 10 потенциальных факторов регуляции транскрипции. Для дальнейшего экспериментального исследования было выбрано 4 потенциальных фактора транскрипции (*MraZ*, *Xre* (*HsdC*), *Fur* и *WhiA*), два из которых являются консервативными среди бактерий класса Молликут, а два встречаются только у некоторых представителей класса.

Во второй части (подглавы 3.2-3.5) проведена работа по поиску сайтов связывания этих факторов и выяснению их роли в регуляции экспрессии генов. Помимо подтверждения способности транскрипционных факторов связываться с обнаруженными последовательностями, Евсютина Д.В. также оценила вклад нуклеотидов сайта в специфичность взаимодействия белка с ДНК.

Третья часть работы была направлена на поиск и валидацию генов - мишеней регуляторов, то есть таких генов, чья экспрессия находится под влиянием регулятора, но сам регулятор не известен. Для этого были использованы данные расчётной модели, которая по последовательности промотора предсказывает его «силу» и определены гены, чей рассчитанный уровень экспрессии отличается от полученного экспериментальным путем. Затем Евсютиной Д.В. был сконструирован вектор, содержащий репортерный ген *egfp*; внося разные промоторные области был оценен уровень экспрессии этого гена и сделан вывод о влиянии разных последовательностей на транскрипцию гена *egfp*. В результате было показано, что промоторные области генов *uvrB*, *parA*, *rplJ* действительно содержат участки, которые могут влиять уровень мРНК. Евсютиной Д.В.

совместно с коллегами, для гена *parA* удалось установить сам регулятор и охарактеризовать его сайты связывания. В последней части работы была предпринята попытка поиска механизмов регуляции трансляции у *M. gallisepticum* при тепловом стрессе. Для этого была выделена фракция мРНК, связанная с рибосомами из культуры микоплазмы, выращенной в нормальных условиях и под воздействием теплового стресса. Анализ относительной представленности мРНК при стрессе показал изменение уровня большого числа транскриптов, общие детерминанты не были обнаружены. При переходе от относительного к абсолютным значениям уровня мРНК, удалось разделить ответ клетки на две части – транскрипционный шум и адаптивный ответ, в результате которого согласно данным транслятома, увеличивается уровень мРНК, кодирующие шаперон ClpB, иммуноглобулин-связывающие белки, белки, участвующие в делении клетки и несколько белков с неизвестной функцией.

В целом результаты исследования четко сформулированы и иллюстрированы. Выводы соответствуют полученным результатам. Тем не менее, к диссертации имеются несколько вопросов и замечаний.

Концентрация всех результатов работы в одном разделе «Результаты и обсуждение» делает этот раздел диссертации перегруженным (семь подглав!), в частности, из-за немного избыточной для кандидатской диссертации вложенной нумерации. Возможно, разделение результатов на несколько смысловых блоков (глав) сделало бы изложение материала более ясным.

Спорно приведённое в литературном обзоре на стр. 26 (2-й абзац) утверждение о том, что «микоплазмы стали главными объектами в системной биологии». В конце следующего абзаца сказано, что интеграция омиксных данных позволит создать модель, которая может описать и предсказать поведение живой системы. Не оспариваю этот тезис с учётом того, что первая в мире компьютерная модель клетки полногеномного масштаба, опубликованная Дж. Карром, М. Ковертом и коллегами в журнале *Cell* в 2012

году, описывала именно микоплазму (*M. genitalium*). Но меня удивило, что в диссертации этот тезис подкреплён ссылкой 2003 (!) года. Не очень понятно второе предложение последнего абзаца литературного обзора: «Высокая гетерогенность экспрессии внутри оперона, синтез большого количества анти-смысловых транскриптов.» (стр. 30).

В разделе «Результаты и обсуждение», подглава 3.1, сказано, что размер генома молликут коррелирует с количеством предсказанных факторов регуляции транскрипции (стр. 50). Непонятно, это литературные данные или полученные в данной работе. Если первое, хорошо было бы привести ссылку на статью, если второе – график с корреляцией, или, хотя бы, её численное значение.

В подразделе 3.3.4, в самом конце 61-й страницы говорится об усложнении регуляторной сети – единственной из описанных ранее. Описанных где – в данной работе или вообще?

На странице 63 говорится: «В геномах микоплазм найдена одна копия гена, кодирующего белки семейства FUR». Не очень понятно, как одна копия гена кодирует белки целого семейства.

На странице 67 сказано: «Уровень экспрессии *zip* в клетках Mga_wt, Mga_dcas9 увеличился в 5–6 раз в ответ на добавление 2,2'-дипиридила. При этом уровень *fur* не менялся». Следует ли последнее предложение понимать как «уровень *fur* **значимо** не менялся», как это следует из рисунка 3.18?

На странице 69 указано: «Различия в core мотиве могут быть обусловлены разным содержанием ГЦ пар в геноме рассматриваемых бактерий (Рисунок 3.19 Б).» Рецензент не понял, как рисунок 3.19 объясняет это предложение, особенно с учётом того, что на рисунке 3.19 нет частей А), Б) и т.д.

Остальная часть замечаний носит редакционный и стилистический характер. Так, достаточно осязаемое количество рисунков имеют малый размер или низкое качество и из-за этого трудно читаемы (например, рис. 1.2, 1.4, 2.6, 3.5).

Отсутствует единообразие в использовании некоторых терминов – например, Rho-независимая/ ρ -независимая терминация транскрипции, σ фактор/сигма-фактор/сигма фактор и т.д. Некоторые термины переведены не очень удачно – например, «маленькие молекулы» на стр. 12. В отдельных случаях перепутаны обозначения генов и белков – например, на стр. 16 «Одним из представителей таких бифункциональных белков является белок *putA E.coli*, который катализирует двухстадийную деградацию пролина до глутамата...» – белок обозначен как ген.

В тексте встречаются пунктуационные и грамматические ошибки, жаргонизмы.

Вместе с тем, указанные замечания носят преимущественно стилистический и технический характер, частично дискуссионны, и совершенно не умаляют значимости диссертации. Диссертационная работа Евсютиной Дарьи Викторовны является законченным исследованием, выполненном на высоком методическом и научном уровне. Считаю, что эта работа вносит значимый вклад в развитие системной биологии в Российской Федерации.

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.3 (03.01.03) – «Молекулярная биология» (по биологическим 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 приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Евсютина Дарья Викторовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 (03.01.03) – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник
сектора биоинформатики и информационных технологий в генетике
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»

ЛАШИН Сергей Александрович

28 ноября 2022 г.

Контактные данные:

тел.: +7 (383) 363-49-63*1331, e-mail: lashin@bionet.nsc.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.09 – Математическая биология, биоинформатика

Адрес места работы:

630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 10,
ФИЦ Институт Цитологии и Генетики СО РАН,
Сектор биоинформатики и информационных технологий в генетике,
Тел.: +7 (383) 363-49-80; e-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru

Подпись сотрудника

*ученый секретарь
Срнова*

*Лашин С.А. Удостоверено
ИЦиГ СО РАН, в.д.н.
Лаврентьева*

