

Отзыв официального оппонента на диссертационную работу

Григорова Артема Сергеевича

«Роль малых регуляторных РНК микобактерий в адаптации к стрессам»,
представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология»

Актуальность темы исследования

Регуляция транскрипции генов – сложный процесс, который «обслуживается» большим количеством белков – факторов транскрипции. Удивительным событием было открытие того факта, что эту роль в бактериях также выполняют десятки малых некодирующих РНК (нкРНК). В настоящее время уже накоплено много доказательств, что эти нкРНК вступают в действие в особые периоды существования клетки, как правило, в моменты стрессовых воздействий на нее.

Диссертационная работа Григорова Артема Сергеевича посвящена изучению роли малых некодирующих РНК микобактерий. Объектами исследования являлись – *Mycobacterium tuberculosis* – возбудитель туберкулеза и непатогенный вид – *Mycobacterium smegmatis*. Важность изучения этих нкРНК определяется их центральной ролью в регуляции различных клеточных процессов, включая механизмы выживания в разнообразных условиях окружающей среды. Такие исследования обеспечивают понимание путей эволюции и адаптации, которые могут привести к появлению патогенных штаммов. В связи с этим, актуальность данного исследования не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Григорова А.С. существенно обогащает текущее представление о малых РНК в контексте функционирования микобактерий и предоставляет ценные направления для дальнейших исследований в области молекулярной микробиологии и биомедицины.

Степень обоснованности результатов

Экспериментальная логика исследования соответствует поставленным целям, а использованные Григоровым А.С. методы адекватны задачам работы. Достоверность результатов обеспечена использованием статистически репрезентативных выборок и современных методов молекулярной биологии. Полученные в исследовании данные характеризуются статистической надежностью и внутренне непротиворечивы.

Научная новизна и значимость исследования

В работе Григорова А.С. раскрыто несколько новых аспектов, относящихся к изучению малых некодирующих РНК микобактерий. В частности, впервые проведен транскриптомный

анализ микобактерий под действием холодового стресса и выявлены малые РНК, которые могут играть роль в этом процесса; впервые установлена функция, молекулярная мишень и механизм действия малой РНК F6 *M. smegmatis*; впервые продемонстрирована роль малой некодирующей РНК MTS1338 *M. tuberculosis* в контексте инфекции. Полученные данные являются важными как для фундаментальной науки, так и представляют интерес для прикладных биомедицинских направлений, поскольку могут способствовать разработке новых методов диагностики и терапии инфекционных заболеваний, вызванных микобактериями.

Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа изложена на 162 страницах и имеет традиционную структуру, включающую следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение и выводы. Диссертация содержит 51 иллюстрацию, 1 таблицу и 19 приложений. Список литературы включает 189 источников.

Во введении автор обосновывает актуальность, новизну и практическую значимость диссертации, формулирует цели и задачи исследования, а также приводит положения, вынесенные на защиту.

Обзор литературы, представленный в диссертации, всесторонне освещает текущее положение в области изучения малых некодирующих РНК микобактерий, а также систематизирует методы, используемые при их изучении. В обзоре рассматривается история аннотации нкРНК в микобактериях и представлены примеры изученных нкРНК, для которых были показаны молекулярные мишени и механизмы действия.

В главе «Материалы и методы» описаны объекты исследования, условия культивирования клеточных культур и протоколы методов, использованных в исследовании. В диссертационной работе был использован широкий набор современных молекулярно-биологических, биохимических и биоинформатических методов. Автор также приводит описание всей последовательности статистического анализа для обработки данных высокопроизводительного секвенирования.

Глава «Результаты и обсуждение» содержит 3 тематически связанных части, каждая из которых посвящена исследованию отдельной научной проблемы. Первая часть работы представляет собой детальное изучение реакции микобактерий на холодовой стресс, выполненное на модельном организме *M. smegmatis*. Используя технологию высокопроизводительного секвенирования, Григоров А.С. провел транскриптомный анализ микроорганизма в динамике под действием низких температур и выявил как адаптационные изменения, происходящие на уровне белок-кодирующих транскриптов, так и идентифицировал малые некодирующие РНК, которые могут участвовать в адаптации *M. smegmatis* к холоду. Всего

было выявлено 56 нкРНК, среди которых ранее было описано всего только 5. Автор также приводит предполагаемые мишени обнаруженных нкРНК, предсказанные с помощью биоинформатического анализа. Всегда особое уважение вызывают диссертации, которые дают импульс и направление новых исследований. Это относится и к проведенному Григоровым А.С. систематическому изучению реакции микобактерий на холодовой стресс на базе транскриптомного анализа. Следующей задачей будет экспериментальное подтверждение участия нкРНК бактерий в адаптации к низким температурам с помощью других молекулярно-биологических подходов.

Во второй части работы исследуется роль малой некодирующей РНК F6 микобактерии *M. smegmatis*. В этом исследовании был применен классический подход создания немаркированного мутантного штамма *M. smegmatis* с его последующей характеристикой с помощью высокопроизводительного секвенирования транскриптома, а также ряда биохимических и микробиологических экспериментов. Автору удалось идентифицировать фенотип, возникающий при делеции гена этой малой РНК и показать прямую молекулярную мишень, которая располагается в 5'-нетранслируемой области мРНК гена фактора ресусцитации RpfE2. Основным результатом исследования заключается в том, что F6 необходима для нормального перехода микобактерии в некультивируемое состояние. Показано, что малая РНК F6 участвует в регуляции транскрипции ряда генов, связанных с адаптацией к окислительному стрессу. В целом, данная часть работы представляет законченное и проработанное исследование, которое значительно расширяет понимание о функциях малых РНК в микобактериях.

В третьем разделе главы описывается изучение малой некодирующей РНК MTS1338, свойственной только микобактериям туберкулезного комплекса. Проведенные эксперименты раскрывают последовательность событий, приводящих к активации транскрипции MTS1338 в модели заражения *ex vivo*, и демонстрируют, что необходимым для этого условиям является предварительная активация макрофагов интерфероном-гамма. Полнотранскриптомный подход, примененный в рамках этого исследования, позволил выявить гены *M. tuberculosis*, транскрипция которых возрастает при гиперэкспрессии MTS1338. Приведенная автором функциональная характеристика этих генов свидетельствует в пользу гипотезы о том, что малая РНК MTS1338 участвует в адаптации к условиям внутри макрофага. К схожим выводам приводят и эксперименты с гетерологичной транскрипцией MTS1338 в непатогенной микобактерии *M. smegmatis*: штамм с гетерологичной транскрипцией характеризовался повышенной выживаемостью при заражении макрофагов *ex vivo* по сравнению с контрольным штаммом. Подробное исследование инфицированных макрофагов с помощью конфокальной микроскопии показало, что гетерологичная экспрессия MTS1338 приводит к снижению колокализации бактерий с кислыми компартментами клетки, что, вероятно, является причиной повышенной

выживаемости бактерий данного рекомбинантного штамма. Характеристика данного штамма с помощью дополнительных экспериментов показывает, что гетерологичная экспрессия малой РНК MTS1338 приводит как к изменению белкового профиля самой бактерии, так и к модуляции баланса цитокинов макрофага. Таким образом, на основе представленных данных можно утверждать, что малая некодирующая РНК MTS1338 играет значительную роль в контексте инфекции, влияя на адаптацию микобактерий внутри макрофага.

В заключении Григоров А.С. суммирует полученные результаты и акцентируя их важность для дальнейшего изучения микобактерий. Приведенные выводы отвечают поставленным в исследовании задачам.

Замечания

Диссертационная работа Григорова А.С. выполнена на очень высоком уровне. Указанные ниже замечания носят рекомендательный характер и не снижают ее высокой оценки

- 1) Хотелось бы понять насколько данные о роли нкРНК (в частности F6), полученные для *Mycobacterium smegmatis* могут быть экстраполированы на *Mycobacterium tuberculosis*. Было бы полезным привести данные по сравнению тех участков геномов этих бактерий, которые могут быть вовлечены во взаимодействие с нкРНК.
- 2) В разделе 3.2.4. проводится оценка транскрипции гена нкРНК F6 в условиях кислого и окислительного стрессов методом нозерн-блоттинга. В тексте не поясняется, почему для оценки выбрана именно средняя логарифмическая фаза роста штамма MSM_WT. Возможно, в других фазах роста отличия в эффективности транскрипции в нормальных условиях и в условиях стрессов были бы более существенными.
- 3) В подписи к рис. 33 (стр. 90), на котором приведена оптическая плотность жидких культур штаммов MSM_WT и $\Delta F6$ *M. smegmatis*, измеренная в условиях окислительного стресса, а также в тексте не указано в какой фазе роста были отобраны пробы. Концентрация перекиси водорода в подписи к рисунку составляет 500 мкМ, а в разделе 2.15 (стр. 53, глава «Материалы и методы») 5 мкМ. Какое из значений является верным?
- 4) В разделе 2.17. главы «Материалы и методы» автору следовало бы указать, что эксперименты с мышами проводилась не им, а сотрудниками ЦНИИ туберкулеза с указанием их фамилий.
- 5) В работе имеются опечатки и ряд недочетов.
 - Англицизмы – характеризация, секвестрация, рестрицировали.
 - Некорректным является термин фосфатно-солевой буфер. Следовало бы указать, какой именно буфер использовали – натрий- или калий-фосфатный и pH раствора.
 - В Приложениях Л, С, У, Ф белки (продукты) и их функции должны быть указаны по-русски.

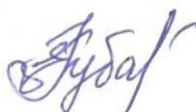
Заключение

Диссертационная работа Григорова А.С. представляет собой законченное, масштабное и комплексное исследование роли малых некодирующих РНК в адаптации микобактерий к новым условиям существования, выполненное на мировом уровне. Полученные диссертантом данные позволяют расширить наши знания о молекулярных механизмах адаптации *Mycobacterium smegmatis* и *Mycobacterium tuberculosis* к холодовому и окислительному стрессам, переходу в некультивируемое состояние и жизнедеятельности внутри макрофага, что обеспечивает основу для разработки новаторских подходов в диагностике и лечении туберкулеза.

Диссертационная работа Григорова Артема Сергеевича «Роль малых регуляторных РНК микобактерий в адаптации к стрессам» соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - «Молекулярная биология».

Официальный оппонент

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



Кубарева Елена Александровна

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

Подпись Кубаревой Е.А. удостоверяю.

И.о. директора Научно-исследовательского института физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего
образования «Московский государственный
университет имени М.В.Ломоносова»,
член-корреспондент РАН, профессор



П.В. Сергиев

«15» ноября 2023 г.