

**Отзыв официального оппонента**  
доктора биологических наук Мокроусова Игоря Владиславовича 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 исследования**

Актуальность исследования малых РНК микобактерий обусловлена значительной ролью этих молекул в регуляции биологических процессов, включая патогенез и адаптацию возбудителей туберкулеза к различным условиям среды, в том числе к стрессам. Малые некодирующие РНК являются ключевыми элементами пост-транскрипционного контроля, модулирующими экспрессию генов в ответ на изменения внешней и внутренней среды, и поэтому могут играть важную роль в механизмах резистентности, патогенности и выживаемости микобактерий. Исследование малых РНК предоставляет новые перспективы для понимания молекулярных механизмов, которые могут быть использованы для разработки новых подходов к диагностике, терапии и созданию вакцин против туберкулеза. Настоящее исследование способствует заполнению пробелов в знаниях о роли малых РНК в жизнедеятельности микобактерий и открывает новые горизонты для молекулярной микробиологии и биомедицинских приложений.

**Структура диссертации**

Структура диссертационной работы строго соответствует научным стандартам и включает в себя вступление, обзор литературы по изучаемой проблематике, описание материалов и методов исследования, результаты работы и их обсуждение, заключение и выводы. В дополнение к этому, диссертация содержит список использованных источников и приложения, в которых представлены дополнительные материалы и данные, необходимые для полного понимания проведенного исследования. Работа изложена на 162 страницах, содержит 1 таблицу, 51 рисунок. Список литературы включает 189 источников.

Во вступительной части диссертации обосновывается актуальность исследования малых РНК микобактерий, определяются ключевые цели и задачи работы. Автор подробно характеризует научную новизну и практическую ценность исследования, а также очерчивает методологический аппарат, использованный в ходе работы. Представленные к защите положения отражают достигнутые результаты и их значимость. Обоснованность и достоверность исследования подкрепляются соответствующими публикациями в международных научных журналах и выступлениями на профильных научных конференциях.

В разделе обзора литературы диссертационной работы А.С. Григоров комплексно рассматривает современное состояние знаний о малых РНК микобактерий, акцентируя внимание на роли отдельных известных РНК в адаптации к различным стрессовым условиям. Обсуждаются последние открытия в этой области, а также методологические подходы к изучению малых РНК, что создает основу для понимания вклада данной работы в развитие области молекулярной биологии. Этот раздел оправдывает выбранную методологию и направления исследования, представленные в дальнейших главах диссертации.

В разделе «Материалы и методы исследования» диссертации представлено подробное описание всех экспериментальных подходов, применяемых в исследовании. Особое внимание уделяется описанию методов культивирования микобактерий, условий их стрессирования, а также последующему выделению и анализу РНК с использованием высокопроизводительного секвенирования, количественной ПЦР и других молекулярно-биологических техник. Раздел отражает высокий уровень экспериментальной работы, глубину анализа полученных данных и умение автора работать с передовыми инструментами молекулярной биологии и биоинформатики.

Раздел "Результаты и обсуждение" демонстрирует комплексный анализ, проведённый автором по трем ключевым направлениям исследования малых РНК микобактерий. В первой главе исследуется транскриптомный ответ микобактерий на холодостресс на примере *M. smegmatis*. В фокусе внимания находятся малые РНК, которые меняют свою экспрессию в условиях низких температур и могут играть роль в адаптации к изменениям температуры. С помощью биоинформатических алгоритмов, на основе данных РНК-секвенирования короткой фракции были выявлены границы генов потенциальных малых РНК и определены их экспрессионные профили в динамике холодостресса. Для выявленных малых РНК были предсказаны потенциальные мРНК мишени и определены пути, на которые они могут влиять. Полученные в рамках этого исследования полнотранскриптомные данные, описывающие реакцию *M. smegmatis* на низкие температуры, могут стать хорошим фундаментом для будущих исследований в данной области.

Вторая глава посвящена исследованию малой некодирующей РНК F6 микобактерии *M. smegmatis*. Обнаруженная как у патогенных, так и у непатогенных видов микобактерий, эта РНК выделяется своей консервативностью. В ходе исследования был создан мутантный штамм *M. smegmatis* с делецией гена, кодирующего F6, благодаря чему удалось выявить отличия в поведении мутантных бактерий по сравнению с диким типом, включая изменение в склонности к агрегации и повышенную выживаемость под воздействием окислительного стресса. Транскриптомный анализ показал изменения в экспрессии генов, связанных с ресусцитацией и ответом на окислительный стресс, что предполагает влияние F6 на эти процессы. В частности, было выявлено, что малая нкРНК F6 взаимодействует с мРНК гена фактора ресусцитации *MSMEG\_4640*, что было подтверждено в экспериментах *in vivo*. Наконец, исследование показало, что делеция F6

нарушает способность микобактерий переходить в состояние покоя, что подчеркивает важность этой нкРНК для жизнедеятельности и адаптации микобактерий. Комплементация гена F6 приводит к нормализации этой способности, что указывает на его ключевую роль в регуляции состояния бактериального покоя. Целом, данная часть исследования демонстрирует редкий случай, когда был не только выявлен фенотипический эффект, возникший в результате удаления малой РНК, но и точно описана молекулярная цель и механизм действия этой РНК.

Третья часть исследования посвящена изучению роли малой РНК MTS1338 в адаптации *M. tuberculosis* к условиям персистенции внутри макрофагов. Эксперименты показали, что транскрипция MTS1338 увеличивается в условиях заражения при активации макрофагов гамма-интерфероном, что указывает на её связь с адаптацией к иммунному ответу. Было продемонстрировано, что гиперэкспрессия MTS1338 в *M. tuberculosis* увеличивает устойчивость бактерии к ряду стрессов и приводит к активации транскрипции ряда генов, важных для микобактериальной адаптации. Эксперименты с гетерологичной транскрипцией MTS1338 в непатогенной бактерии *M. smegmatis* показали, что экспрессия этой малой РНК приводит к изменениям, сходным с наблюдаемыми при гиперэкспрессии в *M. tuberculosis*, включая замедление роста и улучшение выживаемости в макрофагах. Также было обнаружено влияние на цитокиновый профиль макрофагов, что подчеркивает важность MTS1338 в модуляции иммунного ответа хозяина. В заключение, гетерологичная транскрипция MTS1338 в *M. smegmatis* вызывает изменения в протеомном и секретомном белковых профилях, что может способствовать более успешному уклонению бактерии от иммунного ответа хозяина. В общем, данная часть исследования подтверждает гипотезу о том, что малые РНК, такие как MTS1338, играют важную роль в адаптации *M. tuberculosis* к внутриклеточным условиям и могут быть целью для разработки новых стратегий лечения туберкулеза.

Автор работы представил выводы, которые полностью подтверждаются экспериментальными данными и соответствуют целям исследования.

### **Замечания к диссертационной работе**

Общее и частное впечатление очень хорошее, но есть несколько несущественных замечаний: в тексте появляются опечатки и иногда встречаются не совсем точные формулировки, которые, тем не менее, не снижают общего качества представленного материала.

Также у меня возникли **вопросы для дискуссии**:

1. Как холодовой стресс влияет на общую физиологию и метаболизм бактерий, и есть ли данные о долгосрочных адаптациях к низким температурам? Идентифицированы ли конкретные белки или пути сигнализации, которые активируются или подавляются при холодовом стрессе?

2. В какой степени экспрессия малой РНК F6 может участвовать в адаптации *M. smegmatis* к антибиотикам и возможно ли аналогичное влияние в *M. tuberculosis*?
3. Имеются ли данные о том, как изменения в экспрессии идентифицированных генов, которые происходят при гиперэкспрессии MTS1338, коррелируют с изменениями в физиологии и поведении бактерий?

### Заключение

Диссертационная работа Григорова Артема Сергеевича 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

Мокроусов Игорь Владиславович  
Заведующий лабораторией  
молекулярной эпидемиологии и  
эволюционной генетики  
Федерального бюджетного учреждения науки  
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский  
институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Доктор биологических наук  
Шифр специальности 1.5.11 [03.00.07] - «микробиология»

Адрес:  
197101, Санкт-Петербург,  
ул. Мира, д. 14  
Тел. +78126446380  
Адрес электронной почты: [imokrousov@mail.ru](mailto:imokrousov@mail.ru)

Подпись Мокроусова И.В.  
«удостоверяю»

Ученый секретарь ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский  
институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»  
к.м.н. Трифонова Г. В.

03.11.2023

