

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента на диссертационную работу

**Летягиной Анны Евгеньевны**

**«Анализ влияния последовательности, расположенной после сайта полиаденилирования, на уровень зрелой мРНК репортёрного гена eGFP в культивируемых клетках человека НЕК293Т»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика

### **Актуальность исследования**

Тема диссертационного исследования является актуальной в области молекулярной биологии и генетики. Регуляция экспрессии генов на уровне терминации транскрипции и процессинга 3'-конца мРНК остаётся недостаточно изученной, особенно в контексте роли последовательностей, расположенных ниже сигналов полиаденилирования (DSE). Работа направлена на системное изучение влияния нуклеотидного состава DSE на уровень зрелой мРНК, что имеет как фундаментальное значение для понимания механизмов экспрессии генов у эукариот, так и практический потенциал для биотехнологии и генетической инженерии.

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

Диссертация Летягиной А.Е. демонстрирует высокую научную новизну благодаря использованию передовых методов анализа особенностей терминации транскрипции. Впервые проведён системный анализ влияния последовательности DSE на уровень зрелой мРНК с использованием метода массового параллельного репортёрного анализа (МПРА). Установлено, что наибольшее влияние на экспрессию оказывает район +17..+40 п.н. после сигнала полиаденилирования (СПА). Показана корреляция между стабильностью предсказанной вторичной структуры РНК в области после СПА и уровнем зрелой мРНК. Разработана модель машинного обучения DoSIA, способная предсказывать уровень экспрессии на основе последовательности DSE, что открывает возможности для рационального дизайна терминаторов транскрипции.

### **Структура работы, достоверность и обоснованность научных результатов**

В диссертационной работе Летягиной А.Е. четко сформулированы цель и задачи, предложены адекватные экспериментальные подходы. Сама работа изложена по традиционной схеме, состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов,

Результатов, Заключение и Выводов. Многочисленные иллюстрации и схемы, представленные в диссертации, значительно облегчают восприятие сложного материала.

В обзоре литературы достаточно подробно описан процесс терминации транскрипции, представлены современные представления о механизмах. Особое внимание уделено организации СПА и известным данным о белках, взаимодействующих с участками, прилегающими к СПА. Отдельная глава посвящена описанию возможностей МПРА и деталей интерпретации данных в исследованиях особенностей функционирования цис-последовательностей.

В работе использован широкий спектр современных молекулярно-генетических и биоинформатических методов: методы молекулярного клонирования; метод МПРА для анализа большого количества последовательностей; высокопроизводительное секвенирование для количественной оценки уровня транскриптов; методы биоинформатики и машинного обучения для обработки данных и построения предсказательных моделей; экспериментальная валидация предсказанных последовательностей с использованием кПЦР, флуоресцентной микроскопии и FACS; обучение моделей, предсказывающих уровень зрелой мРНК. Особо следует отметить разработку автором собственного программного обеспечения (MPRAdecoder, DoSIA, DSEgenerator), что свидетельствует о высокой квалификации в области биоинформатики. Автор подробно описывает методы и подходы, используемые в работе, что делает её понятной для широкого круга специалистов. Результаты работы являются достоверными и хорошо обоснованными. Статистическая обработка данных выполнена корректно. Каждый вывод подкреплён экспериментальными данными или результатами моделирования.

Раздел «Результаты» состоит из трех глав, каждая из которых посвящена отдельному аспекту исследования. Отдельно хочу отметить цельность всей работы, взаимосвязь всех ее разделов. В первой главе непосредственно описываются детали проведенного МПРА, дано подробное описание возникающих сложностей. Автор обращает внимание на все детали проведения эксперимента, описывает все контрольные и вспомогательные работы. В результате делается вывод о том, что наибольшее влияние на уровень зрелой мРНК оказывают последовательности, расположенные в районе +17..+40 н. после СПА. Во второй главе методы классического машинного обучения применяются для обучения моделей, предсказывающих уровень экспрессии репортёра в зависимости от последовательности, прилегающей к СПА. В результате была разработана модель DoSIA, которая позволяет предсказать уровень зрелой мРНК при замене района, расположенного с 3 по 38 н. после СПА, на любую последовательность соответствующей длины. В последней главе разработанная модель сравнивается с уже известной APARENT2. Стоит

отметить, что был проведен не только теоретический анализ, но и экспериментальная валидация предсказанных нуклеотидных замен, способных влиять на уровень экспрессии репортера. Полученные экспериментальные данные согласуются с предсказаниями DoSIA, что говорит о возможностях использования созданного инструмента для разработки новых синтетических терминаторов транскрипции РНК-полимеразы II, обеспечивающих желаемый уровень зрелой мРНК и белка целевого гена.

Диссертация завершается разделом «Заключение» и грамотно сформулированными выводами, полностью соответствующими поставленным задачам исследования.

Результаты работы апробированы на конференциях и опубликованы в трех статьях в рецензируемых зарубежных журналах. Личный вклад автора является определяющим.

Работа имеет существенную теоретическую значимость, внося вклад в понимание механизмов терминации транскрипции и регуляции экспрессии генов у млекопитающих. Практическая значимость заключается в разработке подхода для рационального дизайна терминаторов транскрипции с заданным уровнем экспрессии, создании инструментов для анализа данных МПРА и предсказания активности последовательностей.

### **Общие вопросы и замечания**

1. Исследование проведено только на одной клеточной линии НЕК293Т. Возникает вопрос о воспроизводимости выявленных закономерностей в других типах клеток. Был ли опыт подобного анализа в других клеточных линиях?
2. Работа выполнена при транзientной трансфекции плазмидных конструкций. В таком варианте не учитывается влияние нуклеосомной укладки и хроматинового окружения при интеграции в геном. Есть ли планы по усилению данной части работы, например, получением и последующим анализом стабильно трансфицированных клеточных пулов?
3. Хотя модель DoSIA показала хорошую предсказательную способность, её валидация на нескольких независимых нативных последовательностях могла бы усилить выводы.

Указанные комментарии и замечания не носят принципиального характера и не снижают научно-практическую значимость выполненной автором работы.

### **Заключение**

Диссертационная работа Лetyгиной А. Е. «Анализ влияния последовательности, расположенной после сайта полиаденилирования, на уровень зрелой мРНК репортёрного гена eGFP в культивируемых клетках человека НЕК293Т» представляет собой

завершенное, методически грамотное и научно обоснованное исследование, вносящее существенный вклад в понимание регуляции экспрессии генов на уровне терминции транскрипции. Работа выполнена на высоком научном уровне, демонстрирует владение автором современными экспериментальными и биоинформатическими методами. Выводы диссертации аргументированы и подтверждены экспериментальными данными.

Работа полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства России от 24 сентября 2013 года №842 (в текущей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Летягина Анна Евгеньевна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика.

Официальный оппонент:

Заместитель директора по научной работе

Федерального государственного бюджетного учреждения

науки Института биологии гена РАН,

руководитель Центра геномных исследований ИБГ РАН,

д.б.н., в.н.с.

Максименко Оксана Геннадьевна

16/01/2026

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки Институт биологии гена  
Российской академии наук

Почтовый индекс: 119334

Адрес: г. Москва, ул.Вавилова, д.34/5

Сайт института: <https://genebiology.ru/>

E-mail института: [info@genebiology.ru](mailto:info@genebiology.ru)

E-mail оппонента: [maksog@mail.ru](mailto:maksog@mail.ru)

Личную подпись Максименко О.Г. заверяю

Ученый секретарь ИБГ РАН, д.б.н.



Набирочкина Е.Н.