

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Шестаковой Екатерины Дмитриевны
на тему: «Роль eIF4G2 в регуляции кэп-зависимой трансляции
у человека»
по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология»

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Е.Д. Шестаковой посвящена исследованию особенностей функционирования белка eIF4G2 в трансляции. Этот белок гомологичен фактору инициации трансляции эукариот 4G (eIF4G). Помимо аминокислотной гомологии, эти белки имеют сходную структуру доменов и связываются с одними и теми же факторами трансляции eIF4A, eIF3. Поэтому, было высказано предположение, что они принимают участие в одних и тех же стадиях инициации трансляции, но в разных условиях в клетке. Хотя имеется большое количество статей, исследующих те или иные особенности функционирования eIF4G2, до сих пор механизм его работы в трансляции и клеточные условия, в которых он работает, остаются малоизученными. Таким образом, тема данной квалификационной работы крайне актуальна для исследования фундаментальных механизмов инициации трансляции.

Кроме того, известно, что белок eIF4G2 важен для ответа клетки на стрессовые условия, а также при эмбриональном развитии организмов. Таким образом, исследование механизма функционирования этого белка в клетках актуально также с практической точки зрения и полученные данные могут быть использованы в разработке стратегий контроля этих процессов.

Научная и практическая значимость работы

Первая часть работы посвящена исследованию уровня экспрессии различных мРНК при подавлении экспрессии eIF4G2 клетках Huh7. Была продемонстрирована зависимость трансляции мРНК AKT2, SMAD1, MYCBP2, PHD2 от наличия этого белка в клетках. Исследовано влияние этого белка на кэп-зависимую трансляцию,

запускаемую как фактором инициации eIF4E, так и фактором инициации eIF3d. Более того, было показано, что влияние фактора eIF4G2 на экспрессию данных мРНК определяется их 5'НТО, а именно наличием в них uORF, а также их ГЦ составом и длиной. Далее, автор исследовала пропускающее сканирование при трансляции мРНК, используя для этого 5'НТО мРНК Maf1, Stard7, Araf1, UCP2 и успешно продемонстрировала участие в этом процессе белка eIF4G2. Уникальные данные были получены при исследовании механизма кэп-зависимой инициации трансляции. Впервые обнаружено, что eIF4G2 участвует в кэп-зависимой трансляции и может заменять eIF4G1 в процессе сканирования. Более того, в сканировании лидерной последовательности эукариотической бицистронной мРНК POLG принимают участие обе изоформы eIF4G. eIF4G2 обеспечивает трансляцию основного цистрона, а инициация трансляции пептида POLGARF обеспечивается фактором eIF4G1. Такой механизм обеспечивает контроль инициации трансляции мРНК POLG белком eIF4G2. Таким образом, автором проведено глубокое исследование роли фактора eIF4G2 в инициации трансляции, которое позволяет существенно расширить наше понимание фундаментальных процессов, происходящих в клетках эукариот в ходе биосинтеза белка.

Структура и содержание диссертации

Диссертация написана в соответствии с требованиями к оформлению диссертационных работ и включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Материалы и методы», «Благодарности», «Список использованной литературы», а также «Приложения». Диссертационная работа изложена на 160 страницах, содержит 45 рисунков и 3 таблицы. Во «Введении» автор формулирует цели и задачи работы, обосновывает ее актуальность, научную и практическую значимость, формулирует положения, выносимые на защиту, кратко описывает методологию исследования, личный вклад соискателя, степень достоверности и апробацию результатов.

В «Обзоре литературы» последовательно излагаются современные данные о механизме инициации трансляции эукариот, вкладе фактора инициации eIF4G, а также подробно освещены основные данные касающиеся структуры и

функционирования белка eIF4G2. Обзор литературы дает полное представление о современном состоянии исследований по теме диссертации и обеспечивает теоретическую подготовку, необходимую для понимания полученных в работе новых результатов.

В главе «Результаты и обсуждение» описаны решения экспериментальных задач, поставленных в ходе работы. Необходимо отметить высокое экспериментальное мастерство, проявленное автором при выполнении диссертационной работы. В работе применялись среди прочих такие методы молекулярной биологии как РНК трансфекция и подавление экспрессии белков с помощью siРНК, требующие исключительного профессионализма в постановке экспериментов. В ходе проведенных исследований автору удалось показать, что исследуемый фактор трансляции участвует как в пропускающем сканировании лидерных последовательностей, так и в реинициации после трансляции uORF. В результате была предложена непротиворечивая модель функционирования белка eIF4G2 в кэп-зависимой инициации трансляции.

Несмотря на несомненную научную ценность полученных результатов диссертационной работы, к ней имеется ряд вопросов и замечаний:

1. Некоторые рисунки имеют низкое разрешение. Например, на рисунке 1 рибосомы испещрены какими-то линиями. Кроме того, большая часть рисунков, иллюстрирующих результаты сделаны очень мелкими. На многих использован такой мелкий шрифт, что его можно прочесть с большим трудом. Для лучшего восприятия я бы рекомендовала разбивать такие рисунки на несколько и увеличивать их в 2–3 раза.

2. На рисунках 13–16 и некоторых других не указана статистическая значимость выявленных различий в экспрессии чувствительных к нокдауну eIF4G2 мРНК с экспрессией контрольных нечувствительных мРНК. Также не совсем очевидно, какие использованы единицы измерения по оси Y, которая подписана «эффект нокдауна».

3. Рисунок 15 (А,Б), на котором показана зависимость трансляции А-кэпированных и кэпированных мРНК от нокдауна eIF4G2 при разных длинах 5'НТО, было сложно

понять. На этом рисунке значения, относящиеся к трансляции А-кэпированных и кэпированных мРНК, нечувствительных к нокдауну eIF4G2, подписаны одной подписью. При этом кэпированные чувствительные к нокдауну мРНК вообще не указаны. Какая точка на графике относится к какой мРНК не очевидно.

4. При анализе влияния eIF4G2 на трансляцию разных мРНК использовали две клеточные культуры – HEK293 и Huh7. Ранее рибосомный профайлинг с подавлением eIF4G2 делали на HEK293. Чем был вызван выбор именно Huh7 как альтернативной линии?

5. В части работы, посвященной замещению фактора eIF4G1 в ходе инициации фактором eIF4G2, использовалась клеточная линия с нокаутом фактора eIF4G3. Таким образом, в одном из экспериментов в клетках одновременно подавляли экспрессию всех факторов инициации eIF4G, однако клетки продолжали функционировать, судя по тому, что в них измеряли уровень трансляции модельных мРНК. Вопрос – каким образом шла инициация трансляции в таких клетках? Имеются еще какие-то факторы инициации, которые могут компенсировать отсутствие всех трех форм eIF4G?

6. Авторы провели очень большую работу по поиску детерминант в лидерах мРНК, обеспечивающих их чувствительность к eIF4G2. Они исследовали влияние наличия uORF, длины лидера, его GC-состава, а также расположения и длины uORF. Полученные данные ясно указывают на важность исследованных детерминант. Однако, если бы авторы, выделив данные параметры лидерных последовательностей, на их основе сконструировали бы модельные мРНК и показали появление чувствительности к eIF4G2, а также собрали бы на них инициаторные комплексы в *in vitro* системах, это бы очень усилило их выводы и подтвердило предлагаемый механизм работы eIF4G2 в инициации трансляции.

Хочу тем не менее отметить, что указанные вопросы и замечания не снижают достоверности и научной значимости диссертационной работы, а призваны лишь обратить внимание на некоторые аспекты, которые можно будет исследовать в будущем.

Глава «Материалы и методы» содержит 7 подразделов и соответствует поставленным экспериментальным задачам. Все экспериментальные процедуры и условия описаны подробно, что позволит при необходимости их воспроизвести.

Достоверность и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационное исследование проведено на современном экспериментальном уровне. Полученные результаты обоснованы и статистически достоверны. Выводы диссертации сформулированы в соответствии с поставленными задачами и полученными результатами. Результаты диссертационной работы Шестаковой Е.Д. опубликованы в 4 статьях в высокорейтинговых международных рецензируемых журналах.

Заключение

В целом, в диссертационной работе получены уникальные важные для понимания функционирования аппарата трансляции результаты, а указанные замечания не снижают значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.3. – «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, и оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Шестакова Екатерина Дмитриевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий
Лабораторией механизмов и контроля трансляции Федерального
государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной
биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

АЛКАЛАЕВА Елена Зиновьевна

подпись

29.01.2024

Контактные данные:

тел.: 7(495)1359977, e-mail: alkalaeva@eimb.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.00.15 – Генетика

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Тел.: 8(499)135-23-11; e-mail: isinfo@eimb.ru

*Подпись Алкалаевой Е.З. удостоверено
Учредителем учреждения ИМБ РАН
Босоров А*