

ОТЗЫВ

официального оппонента Каменского Петра Андреевича на диссертационную работу Шестаковой Екатерины Дмитриевны «Роль eIF4G2 в регуляции кэп-зависимой трансляции у человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология»

Биосинтез белка – уникальный случай молекулярно-биологического процесса, высочайший интерес исследователей к которому не ослабевает ни на секунду с самого момента его открытия во второй трети XX века, то есть вот уже около 50 лет. За этот период множество тематик, побывавших в фокусе внимания профильного научного сообщества, были до известной степени вытеснены из этого фокуса более современными проблемами. С процессом трансляции этого не случилось; надо полагать, что это связано с высочайшей сложностью аппарата биосинтеза белка и с огромным количеством разнообразных регуляторных механизмов, лежащих в основе этого процесса. Именно поэтому, несмотря на десятилетия интенсивных исследований трансляции, говорить о полном понимании молекулярных основ этого процесса не приходится. Это, в свою очередь, заставляет исследователей проводить все новые и новые эксперименты, в ходе которых часто совершаются серьезные научные открытия. Дополнительным стимулом для ученых, занимающихся трансляцией, безусловно, является громадная практическая значимость этого процесса: существенная часть применяемых в медицинской практике антибиотиков действует именно на рибосомы патогенных бактерий. Чем глубже мы будем понимать молекулярные механизмы биосинтеза белка, тем проще будет разрабатывать новые трансляционные антибиотики, а это, как нам всем хорошо известно, крайне актуальная задача современной медицины.

Диссертационная работа Екатерины Дмитриевны Шестаковой является великолепной иллюстрацией тезисов, изложенных в предыдущем абзаце. Эта работа посвящена исследованию плохо изученного фактора инициации трансляции эукариот eIF4G2; в результате проведенных исследований была получена практически полная картина участия этого интересного белка в процессах трансляции. Полученные данные вносят существенный вклад в описание молекулярных механизмов биосинтеза белка у эукариот и открывают перспективы для разработки подходов к регуляции инициации трансляции в клетках.

Исходя из сказанного выше, диссертационная работа Е.Д. Шестаковой обладает высокой актуальностью как для фундаментальной науки, так и, в перспективе, для медицины и сельского хозяйства.

Материал диссертации изложен на 160 страницах машинописного текста, включает в себя 45 рисунков, 3 таблицы и 283 ссылки на использованные литературные источники. Диссертационная работа написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, результатов и обсуждения, заключения, выводов, описания материалов и методов исследования, а также списка цитированной литературы.

Ниже приводится разбор каждого из сутевых разделов работы, однако, как это ни удивительно, я вынужден начать со списка сокращений. Екатерина Дмитриевна подошла к написанию этого раздела с большой педантичностью: он занимает 4 страницы, и в нем, сколько я могу судить, расшифрованы вообще все сокращения, используемые в работе. Это производит очень сильное впечатление.

Раздел «Введение» достаточно короток, но прекрасно выполняет свою основную функцию, а именно вводит читателя в курс дела. Екатерина Дмитриевна в данном разделе постулирует, что в течение многих лет основной функцией белка eIF4G2 в клетках эукариот считалось участие в кэп-независимой инициации трансляции. Однако сейчас в научном сообществе оформилось мнение, согласно которому такая инициация трансляции эукариотических мРНК если и имеет место, то в редчайших случаях, а ранее полученные данные о кэп-независимой инициации объясняются экспериментальными артефактами. Таким образом, роль белка eIF4G2 требует пересмотра, каковым пересмотром и занималась Екатерина Дмитриевна при выполнении своей диссертационной работы.

Далее в работе следует обзор литературы, который ожидаемо посвящен биосинтезу белка в эукариотических клетках, а точнее стадии инициации трансляции. Екатерина Дмитриевна сначала описывает эту стадию трансляции (а также ее регуляцию) в общем, причем делает это хоть и вкратце, но очень емко и с использованием самых последних литературных данных. После этого она переходит к описанию тех моментов, которые так или иначе затронуты ее исследованием: роли предшествующих открытых рамок считывания в инициации, неканонических механизмов инициации биосинтеза белка. И уж затем Екатерина Дмитриевна переходит к изложению информации о белке eIF4G2, причем у меня сложилось ощущение, что эта информация является максимально полной: излагаются все аспекты работы eIF4G2, цитируется огромное количество источников, среди которых в достаточном количестве имеются и самые современные публикации. В целом, обзор литературы производит очень хорошее впечатление. После его прочтения не остается сомнений в том, что Екатерина Дмитриевна очень хорошо ориентируется в тематике своего исследования и умеет работать с научной литературой. С другой стороны, не могу не отметить, что автор разделяет самое распространенное заблуждение молодых ученых: Екатерина Дмитриевна уверена, что

все исследователи и читатели ее работы разбираются в ее тематике так же хорошо, как и она. Вследствие этого она при описании различных литературных данных регулярно пропускает некоторые звенья логических цепочек, в результате чего читателю приходится додумывать их самостоятельно. Это, наверное, даже полезно для тренировки мозга, но несколько затрудняет чтение работы.

После прочтения обзора литературы (да и других разделов работы) мне стало совершенно ясно, что Екатерина Дмитриевна неподдельно и сильно увлечена тематикой своей работы. Такой вывод я сделал не только на основании не только количества и качества материала в работе, но и одного любопытного психологического казуса: Екатерина Дмитриевна совершенно отчетливо относится к рибосомам как к разумным существам! В нескольких десятках мест по тексту работы встречаются пассажи, иллюстрирующие одушевление автором рибосом. Так, в подписи к рисунку 3 на странице 18 (а также в подписях к некоторым другим рисункам) фигурирует «принятие решений рибосомами», а на странице 22 автор заявляет, что «...рибосома имеет склонность пропускать инициаторные кодоны». На самом деле, этот момент, по моему мнению, является лучшим индикатором погруженности Екатерины Дмитриевны в тематику своих исследований, а ведь без такой погруженности хорошую работу не сделать.

А работа у Екатерины Дмитриевны получилась действительно хорошая, что мне стало совершенно ясно после прочтения главного ее раздела, «Результаты и их обсуждение». Этот раздел произвел на меня сильнейшее положительное впечатление. Прежде всего, автор при помощи оригинального экспериментального подхода, основанного на конструировании химерных мРНК, содержащих 5'-НТО различных генов человека и открытую рамку считывания люциферазы, получил достаточно внушительный список мРНК, трансляция которых зависит от eIF4G2 (для этого клетки человека трансфицировались химерными мРНК, после чего проводился нокдаун гена eIF4G2). Затем Екатерина Дмитриевна при помощи вышеописанного набора мРНК убедительно показала, что eIF4G2 участвует исключительно в кэп-зависимой инициации трансляции, окончательно опровергнув гипотезу о вовлеченности данного белка в гипотетическую «внутреннюю инициацию» в клетках эукариот.

После этого автор обратился к вопросу предшествующих открытых рамок считывания (uORF). Дело в том, что в подавляющем большинстве мРНК, трансляция которых зависит от eIF4G2, имеются такие рамки. Проведя громадное множество экспериментов с впечатляющим количеством контролей, Екатерина Дмитриевна заключила, что именно uORF являются детерминантами регуляции трансляции посредством белка eIF4G2. Непосредственно вслед за этим перед автором встал вопрос о конкретном механизме такой регуляции. Дело в том, что трансляция основной рамки в мРНК, содержащих uORF, может инициироваться двумя

различными способами: «пропускающим сканированием», при котором инициации на стартовом кодоне uORF не происходит, и имеет место «долгое» сканирование мРНК перед инициацией на основном старте, либо же посредством реинициации, когда uORF транслируется, но после терминации на ней малая рибосомная субъединица не отсоединяется от мРНК, а продолжает движение по ней, переходя таким образом на первый этап инициации на основной рамке. Логично было бы предположить, что eIF4G2 участвует в каком-либо одном из двух данных механизмов. Именно такое предположение сделала Екатерина Дмитриевна; однако когда она начала проверять его экспериментально посредством использования разнообразных мутантных мРНК, оказалось, что eIF4G2 на одних и тех же матрицах участвует как в пропускающем сканировании, так и в реинициации. Лично мне этот результат показался наиболее интересным из всех результатов данной работы, поскольку случаи равнозначного участия одного белка в двух фактически альтернативных процессах чрезвычайно редки.

Наконец, в последней части работы Екатерина Дмитриевна сфокусировалась на нетипичной для эукариот бицистронной мРНК, кодирующей белки POLG и POLGARF. Эта мРНК также содержит uORF, и автор показал, что трансляция данной мРНК зависит от eIF4G2. Дальнейшие исследования позволили автору описать элегантный молекулярный механизм, в соответствии с которым должно количество обоих белков в клетке достигается комбинацией нескольких факторов, а именно присутствием в бицистронной мРНК uORF и фактом старта трансляции POLGARF с неканонического кодона CUG, эффективного вследствие прилегания к нему с 3'-конца специальной шпильки. Более того, оказалось, что eIF4G2 играет определяющую роль в реализации данного механизма.

Безусловно, у меня есть некоторое количество вопросов и замечаний к разделу «Результаты и их обсуждение». Самое существенное из них носит оформительский характер. Дело в том, что Екатерина Дмитриевна, судя по всему, скопировала рисунки, иллюстрирующие полученные ей результаты, непосредственно из статей, в которых эти результаты были опубликованы. Совершенно ничего плохого в этом нет, однако практически все эти рисунки состоят из множества панелей, и практически всегда бывает так, что разные панели одного рисунка описываются в совершенно разных частях текста (зарегистрированный мной рекорд – 7 страниц между описаниями двух панелей одного рисунка). Очевидно, это очень сильно затрудняет чтение работы, и было бы гораздо лучше, если бы Екатерина Дмитриевна делала из каждого большого рисунка несколько маленьких и приводила бы их текстовые описания в непосредственной близости от них самих. Помимо этого, для данного раздела характерен тот же недостаток, который я отмечал ранее для раздела «Обзор литературы», а именно уверенность автора в том, что читатель погружен в тему исследования так же глубоко, как и автор. Однако это замечание является универсальным для любой

диссертационной работы. По крайней мере, мне не встречались работы, в которых дело обстоит бы по-другому. Более того, в свое время многочисленные оппоненты моих собственных диссертаций все как один сделали мне ровно такое же замечание.

Другие замечания и вопросы:

1. Основным методом, который использовала в своей работе Екатерина Дмитриевна, является уже описанная мной ранее система регистрации сигнала от люциферазы вследствие попадания в клетку химерных молекул мРНК. В целом, система довольно проста, однако в разделе «Результаты и их обсуждение» в принципе отсутствует ее описание, так что первые несколько страниц раздела мне пришлось перечитывать несколько раз, а потом я был вынужден еще и обратиться к оригинальным статьям автора. После этого мне стало более или менее ясно, как работает данная система. Конечно же, следовало бы начать раздел с ее подробного описания; в этом случае понимание читателем результатов было бы существенно упрощено. Более того, у меня нет ощущения, что я разобрался в этом экспериментальном подходе полностью. Так, мне осталось неясным, каким образом контролировался нокадаун гена eIF4G2 и является ли эффективность такого нокадауна постоянной в разных экспериментах. В конце концов, неплохо было бы также видеть какие-то количественные параметры этого нокадауна. Судя по всему, сколько-то белка в клетке после нокадауна остается, но сколько именно (и всегда ли именно столько) – непонятно.

2. На стр.48 автор утверждает, что ранее был получен список мРНК, трансляция которых зависит от eIF4G2 в клетках НЕК293Т. Екатерина Дмитриевна работала с другими клетками, поэтому, помимо всего прочего, повторила соответствующие эксперименты (оказалось, что и здесь дело обстоит так же). Однако в клетках НЕК293Т производилась деплеция eIF4G2 (то есть, надо полагать, нокаут), тогда как Екатерина Дмитриевна в своей работе использовала исключительно нокадаун данного гена. Мне осталось неясным, почему нокадауну было отдано такое безоговорочное предпочтение.

3. Не могу не процитировать подпись к рисунку 15 (стр.51), в которой говорится, что «данные представлены в виде ящиков с усами». После прочтения данной фразы мое воображение разыгралось прямо-таки нешуточно.

4. При анализе взаимосвязи eIF4G2 и uORF в составе исследуемых мРНК среди прочих использовались мРНК APAF1 и Maf1. Обе этих мРНК содержат в своих 5'-НТО по два кодона AUG, открывающих uORF. При этом в эксперименте для оценки вклада eIF4G2 в трансляцию uORF автор в случае Maf1 мутировал оба кодона AUG, а в случае APAF1 – только один из них. Мне не вполне ясно, почему было сделано именно так.

В целом, из моих вопросов и замечаний видно, что никаких серьезных нареканий к результатам Екатерины Дмитриевны у меня не имеется.

К разделу «Материалы и методы», следующему в работе Екатерины Дмитриевны за разделом «Обзор литературы», у меня замечаний практически нет. Автор описывает использованную методологию без излишних технических подробностей, но так, что у читателя складывается четкое представление об объеме выполненной работы, а также о ее экспериментальной специфике. Собственно говоря, Екатерина Дмитриевна, помимо стандартных методов молекулярного клонирования и нокдауна генов, использовала в своей работе фактически только один метод – уже упоминавшуюся выше люциферазную систему. Как это ни странно, это является сильной стороной ее работы: должная постановка контрольных экспериментов и особое внимание, уделяемое статистической значимости результатов, позволили автору сделать корректные и значимые выводы из своей работы, не используя других методов, и очень глубоко вникнуть в молекулярные основы соответствующих процессов.

Должен отметить, что Екатерина Дмитриевна при написании своей диссертационной работы явно находилась под впечатлением статей в высокорейтинговых научных журналах. Именно в таких статьях раздел «Материалы и методы» следует после раздела «Результаты», тогда как в диссертационных работах традиционно используется обратный порядок. Не вижу в этом ни формальной, ни сути проблемы;

Выводы, приведенные в работе, абсолютно корректны и полностью обоснованы полученными результатами.

К разделам «Заключение» и «Список литературы» у меня замечаний нет.

Избранная Екатериной Дмитриевной тема диссертационной работы безусловно актуальна и нова, положения, сформулированные в диссертации, основаны на большом объеме фактического материала, выводы полностью обоснованы совокупностью приведенных данных, статистическая обработка экспериментальных данных адекватна, их достоверность не вызывает сомнений. Высказанные мной замечания не умаляют значимости диссертационного исследования, поскольку являются частными. Работа Екатерины Дмитриевны отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук. 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. Работа оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о

диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Уверен, что Екатерина Дмитриевна Шестакова заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология».

Профессор кафедры молекулярной биологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», доктор биологических наук

Каменский Петр Андреевич

15/01/2024

Шифр и наименование специальности, по которой была защищена диссертация: 1.5.3 – «молекулярная биология».

Адрес организации работы: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Подразделение работы: биологический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», кафедра молекулярной биологии.

Интернет-сайт: <http://www.bio.msu.ru/>

Тел/факс: +7(495)9395485, **e-mail:** peter@protein.bio.msu.ru

Подпись руки доктора биологических наук, профессора Каменского Петра Андреевича заверяю.

Ученый секретарь биологического факультета
МГУ имени М.В.Ломоносова

Е.В.Петрова