

ОТЗЫВ

официального оппонента Лябина Дмитрия Николаевича
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

Актуальность диссертационного исследования

Диссертационная работа Екатерины Дмитриевны Шестаковой представляет собой серьезнейшее исследование механизма специфической регуляции трансляции фактором инициации eIF4G2. Несмотря на имеющиеся подвижки в изучении вышеуказанной проблемы, многое оставалось и остается непонятным и противоречивым. В связи с чем работа Е.Д. Шестаковой является не только актуальной, но и в своем роде прорывной, поскольку в ней предложен механизм участия eIF4G2 в регуляции трансляции специфических мРНК.

Данное исследование представляет интерес не только для фундаментальной науки, но и имеют важное значение для понимания молекулярных механизмов, лежащих в основе патологических процессов или нарушений клеточной дифференцировки при эмбриогенезе.

Структура работы

Материал диссертации изложен на 160 страницах машинописного текста, который включает в себя 45 рисунков и 3 таблицы. Диссертационная работа написана в соответствии с требованиями к оформлению работ и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Материалы и методы исследования», «Список литературы», который содержит 283 ссылки, и «Приложение»

Научная новизна и практическая значимость работы

В диссертационной работе Екатерины Дмитриевны Шестаковой верифицированы новые мРНК, чья трансляция зависит от фактора инициации eIF4G2. При этом показано, что eIF4G2 участвует в кэп-зависимой трансляции, в которой роль кэп-связывающего белка выполняет именно канонический фактор eIF4E, а не eIF3d.

В работе впервые выявлены факторы, определяющие зависимость трансляции некоторых мРНК от eIF4G2. Прежде всего это наличие в 5'НТО предшествующих основной рамке открытых рамок считывания (uORFs, upstream

open reading frames). Автором подробно изучен механизм, благодаря которому наличие uORF приводит к потребности трансляции мРНК в eIF4G2. Предложен убедительная механизм вовлечения eIF4G2 в трансляцию, суть которого состоит в замене утраченного в силу разных причин канонического фактора eIF4G1 в сканирующем комплексе и участии eIF4G2 в пропускающем сканировании и/или реинициации на той же мРНК, что приводит к инициации трансляции на основной рамке считывания.

Кроме того, в работе Екатерины Дмитриевны подробно исследована инициация трансляции уникальной бицистронной мРНК POLG/POLGARF человека, кодирующей каталитическую субъединицу митохондриальной ДНК-полимеразы и функциональный пептид POLGARF. Автором было показано, что наличие uORF, инициация трансляции рамки POLGARF с эффективного за счет примыкающей шпильки стартового кодона CUG (но не AUG) и трансляция с участием eIF4G2 обеспечивают адекватный уровень синтеза обоих белков POLG и POLGARF в условиях кэп-зависимой трансляции.

В целом, результаты исследования существенно дополняют наши знания о механизме регуляции трансляции при участии eIF4G2.

Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов

Положения, сформулированные в диссертации Шестаковой Екатерины Дмитриевны, основаны на большом объеме фактического материала. Выводы обоснованы совокупностью приведенных данных. Статистическая обработка экспериментальных данных адекватна, их достоверность не вызывает сомнений.

Оценка содержания диссертационной работы и ее завершенности

Диссертационная работа по своей структуре и качеству изложения материала соответствует имеющимся стандартам. Во «Введении» автор формулирует цели и задачи работы. Здесь же обосновывается ее актуальность, теоретическая и практическая значимость. В разделе «Обзор литературы» описывается инициация трансляции в эукариотических клетках и её регуляция, а также структура, свойства и известные функции объекта исследования – фактора инициации трансляции eIF4G. Обзор хоть и может показаться кратким, но его можно назвать исчерпывающим. Иллюстративный материал в немалой степени способствует пониманию описываемого материала. Изложение материала весьма гладкое и доходчивое. Стоит отметить малое количество опечаток и ошибок в тексте этой части работы, что, впрочем, относится и ко всему тексту в целом.

Раздел «Материалы и методы» содержит 7 подразделов с подробным описанием примененных автором методик, которые полностью соответствуют поставленным экспериментальным задачам. Особо стоит подчеркнуть, что успех диссертационной работы достигнут использованием довольно небольшого количества методов при их очень умелом, можно сказать, виртуозном применении.

В разделе «Результаты и их обсуждение» автор представляет полученные данные и сопровождает их развернутым обсуждением после практически каждой главы раздела. Последнее в немалой степени помогает оценить читателю довольно трудные для восприятия эксперименты со множеством репортерных конструкций в клетках с и без нокаута факторов инициации. Сильной стороной раздела «Результаты и обсуждения» можно назвать и иллюстративный материал (рисунки, схемы), поскольку рассмотрение рисунков с результатами экспериментов позволяет даже без обращения к тексту диссертации сделать основные выводы, которые совпадают с выводами автора. Производит сильное впечатление тщательность автора в постановке экспериментов и контролей к ним, а также объем проделанной работы – широкий набор мРНК, повторы экспериментов на двух-трех клеточных линиях, использование 2 киРНК для нокаута eIF4G2.

Особо стоит отметить раздел «Заключение», в котором Екатерина Дмитриевна не только подводит итог проделанной работе, но и предлагает свое видение перспектив исследования, описывает пробелы в изучении взаимодействий и функций eIF4G2, нуждающиеся в заполнении.

Раздел «Выводы» содержит 5 утверждений, все из которых не вызывают серьезных нареканий.

В целом после прочтения рукописи не остается сомнений в научной значимости диссертационной работы, в её мировом уровне, а также в ее потенциальной пользе для будущих фундаментальных и прикладных исследований.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертационной работы оформлен по стандартной схеме и соответствует установленным требованиям, материал автореферата точно и достоверно отражает результаты проведенных исследований, дает исчерпывающее представление о содержании диссертации и степени участия автора в исследованиях.

Замечания к диссертационной работе

Серьезных замечаний, которые поставили бы под сомнение выводы диссертационной работы Екатерины Дмитриевны Шестаковой, нет. Тем не менее есть ряд небольших уточняющих вопросов и комментариев относительно результатов работы.

1. Любопытным фактом является появление зависимости трансляции от eIF4G2 для некоторых мРНК в некэпированном виде по сравнению с кэпированным (рис. 15). При том, что eIF4G2 участвует в eIF4E/кэп-зависимой трансляции, на некэпированных матрицах, вероятно, зависимость от eIF4G2 определяется не этим фактом, а участием eIF4G2 в других этапах инициации (сканировании?). Но тогда возникает вопрос, почему на этих же, но кэпированных мРНК eIF4G2 уже не нужен. Возможно, ответ на этот вопрос состоит в следующем. Согласно вашей гипотезе замена eIF4G1 на eIF4G2 в силу различных причин является ключевой в появлении зависимости трансляции мРНК от eIF4G2. Допуская, что для инициации трансляции и кэпированной, и некэпированной мРНК необходим eIF4G1, можно предположить, что отсутствие взаимодействия eIF4G1 с 5' концом некэпированной мРНК (в виду отсутствия кэпа и eIF4E) повышает вероятность диссоциации eIF4G1 и замены на eIF4G2 для дальнейшего сканирования мРНК. При этом в случае кэпированной мРНК вероятность диссоциации eIF4G1 низкая, поэтому потребности в eIF4G2 уже нет. Является ли, на ваш взгляд, данное объяснение пригодным для экспериментов с некэпированной мРНК.
2. В экспериментах с нокадауном eIF3d (рис. 16Б) интересен, возможно, случай с мРНК АКТ2. В тексте написано, что «Зависимость трансляция от eIF4G2 не изменилась ... при деплеции eIF3d...», однако без приведения статистической значимости изменений конкретно для этого рисунка можно сказать, что это не так для мРНК АКТ2. Этот случай, вероятно, нуждается в дальнейшем исследовании.
3. Автор исследует множество факторов, влияющих на eIF4G2-зависимость трансляции мРНК, некоторые из которых в отдельности имеют слабое влияние на эту зависимость (например, расстояние между 5' концом и uORF, расстояние от uORF до основного старт-кодона и т.п.). Возможно ли, что для сильного значимого эффекта eIF4G2 на трансляцию

необходимо сочетание этих особенностей, следствием которого, вероятно является повышение вероятности замены eIF4G1 на eIF4G2?

4. Не вполне ясны «тривиальные алгебраические выкладки» автора для оценки соотношения актов инициации на CUG кодоне POLGARF и старт-кодоне POLG на мРНК POLG/POLGARF(стр. 85), которым приходится просто верить.
5. Предложение «Поскольку такая конструкция транслируется независимо от eIF4G2 (рис. 36А, В, Д), можно с полной уверенностью говорить о том, что eIF4G2 не присутствует в сканирующих комплексах с самого начала, а привлекается к рибосоме по ходу сканирования» (стр. 87) несколько смущает, во-первых, категоричностью, поскольку экспериментов, показывающих наличие eIF4G2 и др. факторов в тех или иных комплексах напрямую не показано. Во-вторых, если трансляция мРНК не зависит от eIF4G2, то возникает вопрос, будет ли этот белок вообще привлекаться к рибосоме по ходу сканирования? Вообще говоря, было бы крайне интересно проследить динамику связывания eIF4G1 и eIF4G2 с мРНК по ходу трансляции на eIF4G2-зависимых и независимых матрицах для подтверждения гипотезы о смене eIF4G1 на eIF4G2.
6. Судя по рисунку 41, можно сказать, что зависимость трансляции мРНК *Maf1* от eIF4G2 обусловлена в большей степени его участием в реинициации трансляции, поскольку мутантная мРНК, инициация трансляции которой идет преимущественно за счет пропускающего сканирования (uORFext), практически не зависит от eIF4G2. Возможно, это не принципиальный момент для диссертации, но можно было обсудить различный вклад реинициации и пропускающего сканирования в eIF4G2-зависимость различных матриц.
7. Рис. 25А – на графике отображены 7 пар образцов, но на оси X подписаны только 6.

Заключение

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», а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5

Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также 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».

Д.б.н., руководитель группы
регуляции биосинтеза белка
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт белка Российской
академии наук
Лябин Дмитрий Николаевич

30 января 2024 г.

Контактные данные:

тел.: 7(916)8292401, e-mail: lyabin@vega.protres.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 1.5.3 – Молекулярная биология

Адрес места работы:

142290, Московская обл. г.Пушино, ул. Институтская, д. 4,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка
Российской академии наук, группа регуляции биосинтеза белка
Тел.: 8(496)7318427; e-mail: lyabin@vega.protres.ru

Подпись сотрудника ИБ РАН
Лябина Дмитрия Николаевича
удостоверяю:

Ученый секретарь ИБ РАН



Е.Ю. Никонова