

**Отзыв на автореферат диссертации
Шестаковой Екатерины Дмитриевны
«Роль eIF4G2 в регуляции кэп-зависимой трансляции у человека»,
представленной к защите на соискание ученой степени
кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология»**

Диссертационная работа Шестаковой Е.Д. посвящена изучению функции эукариотического трансляционного фактора eIF4G2/DAP5. Этот загадочный белок является объектом пристального внимания исследователей на протяжении вот уже четверти века, и тем не менее единого мнения о его роли в биосинтезе белка до сих пор не выработано. Разные группы в разное время высказывали предположения о его участии в IRES-зависимой трансляции, в выборе стартового кодона, в регуляции экспрессии конкретных индивидуальных мРНК, в AUG-независимой трансляции патологических мРНК с повторами и в ряде других процессов. Интерес к теме подогревают также три любопытных факта. Во-первых, ген *EIF4G2* присутствует только в геноме Metazoa, в то время как низшие эукариоты, несмотря на аналогичный трансляционный аппарат, прекрасно обходятся без него. Во-вторых, у всех организмов, в геномах которых обнаружен *EIF4G2*, его кодирующая часть начинается с кодона, отличного от AUG (что для эукариотических белков в целом не очень характерно). Наконец, крайне любопытен паттерн белок-белковых взаимодействий белка eIF4G2: его партнёрами, с одной стороны, являются те же факторы инициации eIF3 и eIF4A, что и у его хорошо изученных паралогов eIF4G1 и eIF4G3 (и это может указывать на его роль в связывании рибосомы с мРНК и в её продвижении по ней при сканировании), а с другой – вместо кэп-связывающего белка eIF4E он взаимодействует с фактором eIF2, который доставляет в 43S-комплекс инициаторную Met-тРНК и таким образом вовлечён, казалось бы, в несколько иной аспект процесса инициации трансляции. Изучению фактора eIF4G2 и гипотезам о его роли в трансляции посвящено более двух сотен работ, что однозначно говорит об актуальности темы исследования.

В 2022 году в лаборатории И.Н. Шатского, в которой работает диссертант, с помощью метода рибосомного профайлинга было идентифицировано некоторое количество мышинных мРНК, чья трансляция проходила менее эффективно в клетках с нокаутом гена *EIF4G2*. Опираясь на эти, а также на ряд других данных, Екатерина выбрала довольно большое количество различных мРНК, предположительно требующих для эффективной трансляции белка eIF4G2, изготовила репортерные конструкции с их 5'-нетранслируемыми областями (5'-НТО) и с помощью метода мРНК-трансфекции выяснила, как сказывается на их трансляции нокдаун *EIF4G2* в клетках человека HEK293T. Сравнив между собой те 5'-НТО, которые придавали мРНК чувствительность к отсутствию eIF4G2, диссертант сделала вывод, что такая зависимость чаще всего определяется наличием в этих 5'-НТО одной или нескольких коротких рамок считывания (uORF), хотя это и не является единственным возможным вариантом. Далее Шестакова изготовила ещё большее количество репортерных конструкций и доказала важность uORF в eIF4G2-

зависимой регуляции, предложив модель, согласно которой изучаемый белок может принимать участие как в пропускающем сканировании, так и в реинициации после прочтения uORF, в обоих случаях увеличивая шансы сканирующего комплекса добраться до стартового кодона основной рамки.

Далее внимание диссертанта привлекла природная бицистронная мРНК *POLGARF/POLG* человека, кодирующая два функциональных белка в двух разных рамках считывания. С неугасающим энтузиазмом Екатерина принялась делать новые молекулярно-генетические конструкции, получать на их основе репортерные мРНК и трансфицировать ими клетки с нокдауном *EIF4G2*. Результатом этой работы явилось выяснение роли uORF и рамки, кодирующей *POLGARF*, а также специфической РНК-шпильки внутри рамки *POLGARF* в инициации трансляции на AUG-кодоне *POLG*, и модель зависимости трансляции этой мРНК от eIF4G2.

Наконец, в заключительной части работы диссертант выяснила, влияет ли как-то на разницу в эффективности трансляции изучаемых мРНК в клетках с нормальным и подавленным уровнем eIF4G нокдаун по мРНК одной из субъединиц фактора eIF3 – eIF3d. Интерес к данному вопросу определялся тем, что в 2021 вышла статья одной влиятельной научной группы из США, в которой утверждалось, что привлечение eIF4G2 на мРНК осуществляется посредством его взаимодействия с eIF3d, который, обладая кэп-связывающими свойствами, играет роль, аналогичную роли канонического кэп-связывающего белка eIF4E в привлечении eIF4G1/3. Результаты, полученные Екатериной, указывают на то, что это, скорее всего, не так.

Таким образом, в ходе работы, описанной в автореферате, диссертанту удалось совершить самый настоящий прорыв в деле изучения функции загадочного фактора eIF4G2. Высокий уровень работы подтверждается также тем, что по материалам диссертации опубликованы 4 статьи в рецензируемых международных научных журналах.

Автореферат подготовлен и оформлен очень качественно. Некоторое косноязычие, прослеживаемое в начале первого раздела, с лихвой компенсируется чёткостью и ясностью изложения материала, понятностью рисунков и отсутствием опечаток и прочих неаккуратностей в оформлении. Из мелких недочётов я бы отметил отсутствие списка цитируемых в автореферате статей (впрочем, список наверняка есть в самой диссертации) и несколько пренебрежительное отношение автора к номенклатуре генов и мРНК (названия которых следует всё-таки писать курсивом, соблюдая при этом соответствующее принятому для данного организма, человека или мыши, использование заглавных и строчных букв). Кстати, при первом упоминании изучаемых мРНК стоило бы, пожалуй, обозначить, в каких случаях речь идёт о мышинных, а в каких – о человеческих мРНК, поскольку теоретически не исключена возможность, что репортерные конструкции, содержащие 5'-НТО мышинных мРНК, в клетках человека могут работать не так, как в природе. Несколько двусмысленно звучит цель исследования: «Целью... являлось изучение...» - всё-таки сам по себе процесс изучения едва ли можно считать целью диссертационной работы; впрочем, это философский вопрос. Ещё одна мелочь –

логическая неточность в конце второго абзаца на стр. 9: «потребность в eIF4G2 возникает во время сканирования uORF или после трансляции uORF» - на самом деле здесь следовало бы включить также и «сканирование области после uORF».

К сути полученных результатов вопросов почти нет. Единственной небольшой претензией я бы назвал вот что. В опытах по выяснению роли eIF3d, можно сказать, отсутствует положительный контроль. Вывод о том, что субъединица eIF3d не задействована в eIF4G2-зависимом механизме, сделан на основании опытов по анализу влияния нокдауна по *EIF3D* – однако откуда мы знаем, что снижение количества белка eIF3d, вызванное нокдауном, было достаточным для проявления эффекта? Действительно, уровень eIF3d в клетках с нокдауном снижен (это показано с помощью Вестерн-блота), но мы ведь не знаем, какой уровень eIF3d необходим для того, чтобы гипотетический механизм работал – быть может, eIF3d не является лимитирующим фактором данного процесса и для его функционирования достаточно совсем невысоко уровня белка. В наборе не было ни одной мРНК, на трансляции которой этот нокдаун хоть как-то сказался. Таким образом, вывод №1 (о том, что роль кэп-связывающего белка при eIF4G2-опосредованном механизме инициации трансляции играет eIF4E, а не eIF3d), мне кажется не совсем строгим. Тем не менее, и этот, и все вышеописанные небольшие недочёты носят частный характер и не отражаются на общей ценности работы и на достоверности основных выводов.

Таким образом, представленная работа полностью удовлетворяет требованиям, установленным в Положении и о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

Дмитриев Сергей Евгеньевич,
кандидат биологических наук,
заведующий отделом взаимодействия вирусов с клеткой
НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

05.02.2024

Адрес организации: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр. 40
Тел: +7-395-939-31-98

E-mail: sergey.dmitriev@belozersky.msu.ru

