

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Пиуновой Ульяны Евгеньевны
на тему: «Изучение молекулярных механизмов инициации трансляции в
митохондриях»
по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология»

Актуальность темы

Диссертационная работа Пиуновой Ульяны Евгеньевны посвящена исследованию регуляции митохондриальной трансляции млекопитающих. Митохондрии это интереснейшие органеллы эукариотических клеток, которые происходят от симбиотических бактерий. От свободноживущих бактерий митохондрии получили «в наследство» аппарат экспрессии генов, включая и аппарат биосинтеза белка, трансляции.

Митохондриальные рибосомы синтезируют ограниченный набор белков, а именно 13, закодированных в крайне редуцированном геноме митохондрий. Биосинтез белка в митохондриях в общих чертах напоминает бактериальный, однако имеет ряд существенных отличий. В частности, митохондриальные мРНК обладают минималистическими 5'-нетранслируемыми областями. Эта особенность делает нетривиальным процесс специфической регуляции трансляции, поскольку выбор индивидуальных мРНК рибосом и эффективность их трансляции оказывается сложно регулировать.

В предыдущих работах, исследующих трансляцию в митохондриях дрожжей были найдены различные РНК-связывающие специфичные белки-регуляторы, каждый из которых, фактически, отвечает за трансляцию определенной митохондриальной мРНК. В данной работе предпринято комплексное исследование подобных белков в системе митохондрий млекопитающих.

Подобное исследование имеет научную новизну. Исследуемый процесс митохондриальной трансляции, а тем более ее регуляции с помощью специфичных малоизученных белков остается во многом весьма загадочным. Более того, исследование имеет и выраженную практическую значимость, поскольку митохондрии чрезвычайно важны для здоровья и благополучия человека.

Мутации в компонентах аппарата митохондриальной трансляции часто приводят к тяжелым патологиям, а угасание функции митохондрий является одним из важнейших факторов старения наших организмов.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

В диссертационной работе были проведены эксперименты по установлению функции трех потенциальных регуляторных белков митохондрии, а именно ZMYND17, SLIRP и PTCD2. Все эти белки выбраны на основе предварительного биоинформатического анализа по их сходству с известными белками - регуляторами трансляции у дрожжей или по другим соображениям. Исследование проводилась самыми современными методами редактирования геномов, а также практически всеми возможными методами, специфичными для области исследования митохондриальной трансляции и функционирования продуктов, т.е. компонентов комплексов дыхательной цепи.

В ходе работы с помощью системы CRISPR/Cas9 были созданы клеточные линии с инактивацией соответствующих генов, а также линии с генетической комплементацией. Для установления белковых партнеров использовался метод ко-иммунопреципитации, а также изучалось взаимодействие исследуемых белков с митохондрией и ее отдельными субчастицами. С помощью меченая вновь синтезированных белков радиоактивной аминокислотой, а также производным аминокислоты, модифицируемым флюоресцентной меткой, исследовалась эффективность

синтеза каждого белка, закодированного в геноме митохондрии. Большая группа методов использовалась для анализа эффективности сборки и работы комплексов дыхательной цепи. В том числе, помимо иммуноблоттинга использовались такие специфические методы, как миграция суперкомплексов в специфическом не денатурирующем геле, измерение активности разделенных таким образом комплексов, а также измерение эффективности дыхания в различных условиях.

Было получено несколько важных результатов. Оказалось, что белок ZMYND17, в отличие от своего дрожжевого гомолога, не является регулятором синтеза конкретных митохондриальных белков. Однако, казалось, что он влияет на ассоциацию субкомплексов АТР-синтазы. Белок SLIRP оказался важен для дыхания, а его отсутствие приводило к нарушению синтеза компонентов цитохром с оксидазы и, соответственно, к нарушению сборки этого белкового комплекса. Наконец, белок PTCD2 также, как оказалось, влияет на синтез митохондриально-кодируемых компонентов IV комплекса дыхательной цепи митохондрий. Это, в свою очередь, приводило к снижению эффективности митохондриального дыхания к сниженной эффективности образования суперкомплексов, в состав которых входит комплекс IV.

Все результаты, представленные в работе, являются новыми и весьма ценными для мировой науки. Об этом свидетельствует и набор публикаций в неплохих международных Российских научных журналах.

Как и всякая хорошая и большая работа, диссертационная работа Пиуновой Ульяны Евгеньевны имеет некоторые несущественные недостатки.

1. Методологически, было бы неплохо использовать при анализе эффективности дыхания не только стимуляцию СССР, но и различные субстраты, а также ингибиторный анализ, дискриминирующий активность различных комплексов дыхательной цепи.

2. Также было бы предпочтительно, при использовании радиоактивного мечення и мечення HPG/флюорофором хотя бы раз сравнить эти методы напрямую.
3. Рис. 16. Визуально кажется, что при нокауте PTCD2 также есть проблемы с синтезом CytB.
4. Рис. 18. Смущает очень небольшая разница между стимулированным и базальным дыханием. Есть ли уверенность в корректности опыта?
5. Почему для ко-преципитации был выбран гексагистидиновый довесок? Он редко используется в таких экспериментах из-за относительно невысокой специфичности выделения и неоптимальной аффинности к смоле.
6. Работа не свободна от опечаток, или небольших неточностей, например
 Стр. 15 «...финальный акцептор, атомарный кислород», Наверное, все же молекулярный?
 Стр. 17 «посредствам кислородного дыхания»
 Стр. 31 «четыре из возьми ферментативных реакций»
 Стр. 39 «раковые клетки эндотелия матки». Эпителия?
 Стр. 80 «в гене этого бекла»
 Стр. 103 «конформационным инменениям»

Разумеется, указанные замечания не умаляют 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, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Пиунова Ульяна Евгеньевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

доктор химических наук, и.о. директора НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

СЕРГИЕВ Петр Владимирович

12.11.2025

Контактные данные:

тел.: 7(916)1114744, e-mail: petya@genebee.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

02.00.10 – биоорганическая химия

Адрес места работы:

11991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 40

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ

Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,

Тел.: 7(495) 9395418; e-mail: petya@genebee.msu.ru