

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 диссертационной работы

Диссертационная работа У.Е. Пиуновой посвящена исследованию роли белков ZMYND17, SLIRP и PTCD2 в тонкой регуляции трансляции в митохондриях клеток человека. Синтез белка в митохондриях представляет собой фундаментальный процесс, от которого напрямую зависит энергетический гомеостаз клетки. Несмотря на бактериальное происхождение, митохондриальный аппарат трансляции приобрел уникальные черты, и его регуляция у млекопитающих остается изученной фрагментарно. В то время как у дрожжей детально описана система транскрипт-специфичных трансляционных активаторов, у человека до недавнего времени был известен лишь один такой белок – TACO1.

Таким образом, идентификация новых регуляторов митохондриальной трансляции и установление их молекулярных функций являются крайне актуальной задачей в области молекулярной биологии. Понимание этих механизмов необходимо для формирования целостной картины того, как координируется экспрессия двух геномов при сборке дыхательных комплексов.

Научная и практическая значимость работы

В работе впервые проведено комплексное исследование функциональной роли белков ZMYND17, SLIRP и PTCD2 в регуляции митохондриальной трансляции в клетках человека. Впервые для белка SLIRP была показана его самостоятельная (независимая от белка-партнера LRPPRC) роль в транскрипт-специфической регуляции инициации трансляции мРНК субъединиц цитохром с оксидазы. Продемонстрирована специфическая разбалансировка синтеза полипептидов митохондрий в отсутствие SLIRP, не связанная с изменением уровня мРНК.

Биохимически подтверждена ассоциация SLIRP с малой субъединицей миторибосомы. Эти данные кардинально меняют представление о функции SLIRP, расширяя ее за рамки вспомогательной роли в комплексе с LRPPRC.

Также, впервые для белка PTCD2 была установлена его роль в качестве трансляционного активатора мРНК субъединицы COIII. Показано, что нокаут PTCD2 приводит к резкому снижению синтеза COIII и нарушению сборки комплекса IV. Биохимически подтверждено взаимодействие PTCD2 с миторибосомой. Полученные данные позволяют классифицировать PTCD2 как второй известный у млекопитающих транскрипт-специфичный активатор трансляции, что существенно углубляет понимание регуляторных сетей в митохондриях.

Более того, для белка ZMYND17 человека установлена его роль в регуляции посттрансляционных этапов сборки комплексов IV и V, но не в процессе трансляции, как у его дрожжевого ортолога Mss51. Проведенный филогенетический анализ объясняет дивергенцию функций этих белков в ходе эволюции.

Необходимо также учитывать, что нарушения митохондриальной трансляции лежат в основе широкого спектра тяжелых заболеваний человека – от митохондриальных энцефаломиопатий до нейродегенеративных патологий и кардиомиопатий. Поэтому поиск и функциональная характеристика новых белков-регуляторов, таких как ZMYND17, SLIRP и PTCD2, важны не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения, так как полученные данные могут стать основой для разработки стратегий диагностики и терапии митохондриальных болезней.

Таким образом, автором проведено масштабное исследование, которое вносит значительный вклад в понимание сложной многокомпонентной сети регуляции синтеза белка в митохондриях. Полученные результаты имеют фундаментальное значение для молекулярной биологии и открывают новые перспективы для изучения патогенеза митохондриальных заболеваний.

Структура и содержание диссертации

Диссертация написана в соответствии с требованиями к оформлению диссертационных работ и включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Диссертационная работа изложена на 115 страницах, содержит 22 рисунка и 10 таблиц. 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 структуре митохондриальных рибосом, механизме инициации трансляции митохондрий, а также вкладе ряда белков в регуляцию трансляции в них. Обзор литературы дает полное представление о современном состоянии исследований по теме диссертации и обеспечивает теоретическую подготовку, необходимую для понимания полученных в работе новых результатов.

Критические замечания к разделу "Обзор литературы"

Несмотря на глубокую проработку материала, литературный обзор обладает некоторым резервом для улучшения своей формы и структуры.

1. Добавление схем и рисунков, иллюстрирующих такие концепции, как организация митохондриального генома или модель регуляции инициации трансляции, стало бы значительным подспорьем для читателя в понимании столь сложного материала.
2. Создание обобщающей таблицы «Сравнение особенностей трансляции у бактерий и в митохондриях млекопитающих» позволило бы в сжатой и наглядной форме представить один из основных концептуальных стержней обзора.
3. Объединение коротких вводных пунктов с последующими более подробными в рамках единой структуры с подпунктами (например, «2.9. Трансляционные активаторы дрожжей» -> «2.9.1. PPR-белки») создало бы более четкую и логичную карту изложения, облегчив ориентацию в тексте.

Указанные замечания носят частный характер и легко могут быть устранены путём редакторской правки без ущерба для содержательной ценности литературного обзора, который в целом представляет собой компетентный и всесторонний анализ современного состояния проблемы.

Глава «**Материалы и методы**» содержит 20 подразделов и соответствует поставленным экспериментальным задачам. Все экспериментальные процедуры и условия описаны подробно, что позволит при необходимости их воспроизвести.

В главах «**Результаты**» и «**Обсуждение**» описаны решения экспериментальных задач, поставленных в ходе работы и проведено сравнение полученных данных с опубликованными другими группами в этой области. Необходимо отметить высокое экспериментальное мастерство, проявленное автором при выполнении диссертационной работы. В работе применялись среди прочих такие методы молекулярной биологии как редактирование генома с помощью системы CRISPR/Cas9 в культурах клеток и сложные методы анализа эффективности трансляции в митохондриях и функционирования митохондрий, требующие исключительного профессионализма в постановке экспериментов. В ходе проведенных исследований автору удалось описать активности двух белков-регуляторов трансляции, **PTCD2** и **SLIRP**, и установить их роль в качестве транскрипт-специфичных активаторов синтеза отдельных субъединиц дыхательных комплексов. Для белка **PTCD2** впервые экспериментально доказана его непосредственная роль в регуляции трансляции мРНК субъединицы **COIII** цитохром с-оксидазы. Полученные данные, включая резкое снижение синтеза **COIII** и нарушение сборки комплекса IV при нокауте **PTCD2**, а также его прямое взаимодействие с миторибосомой, позволили классифицировать этот белок как специализированный активатор трансляции. Для белка **SLIRP** впервые продемонстрирована его самостоятельная роль в регуляции инициации трансляции мРНК субъединиц комплекса IV, независимо от его партнера **LRPPRC**, что коренным образом меняет существовавшие ранее представления о его функции.

Важный вклад в работу внесло исследование третьего белка - **ZMYND17**. В отличие от его дрожжевого ортолога **Mss51**, который функционирует как

трансляционный активатор, для человеческого белка **ZMYND17** была установлена принципиально иная роль. Автор диссертации доказала, что **ZMYND17** не участвует непосредственно в регуляции митохондриальной трансляции, но необходим на посттрансляционных этапах сборки цитохром с оксидазы (комплекс IV) и АТФ-синтазы (комплекс V). Проведенный комплексный биоинформатический анализ эволюционной истории белков **ZMYND17** и **Mss51** объясняет приобретение ими различных функций в ходе эволюции.

В результате была предложена непротиворечивая модель функционирования белков **PTCD2** и **SLIRP** как ключевых компонентов системы тонкой регуляции митохондриальной трансляции у млекопитающих. Согласно этой модели, данные белки обеспечивают точную координацию синтеза митохондриально кодируемых полипептидов с поступлением ядерно кодируемых субъединиц, что необходимо для эффективной сборки дыхательных комплексов и поддержания энергетического гомеостаза клетки. Полученные данные по белку **ZMYND17** дополняют эту картину, демонстрируя существование дополнительного уровня регуляции на этапе посттрансляционной сборки комплексов. Предложенная модель удовлетворительно объясняет молекулярные механизмы, лежащие в основе патологических фенотипов, наблюдаемых при нарушении функций этих белков, и вносит значительный вклад в понимание принципов организации системы экспрессии митохондриальных генов у млекопитающих.

Критические замечания к разделам «Результаты» и «Обсуждение»:

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

1. Неполная молекулярная и фенотипическая характеристика нокаутной линии по гену **ZMYND17**. Представленные в диссертации данные по нокаутным линиям демонстрируют высокий уровень экспериментальной работы. Однако, в отличие от линий с делецией генов **SLIRP** и **PTCD2**, для которых приведены вестерн-блоты, убедительно подтверждающие отсутствие соответствующего белка, валидация нокаутной линии по гену **ZMYND17** представлена не в полном объеме.

- Валидация нокаута: Для полной доказательности отсутствия белка ZMYND17 целесообразно было бы предоставить данные вестерн-блоттинга или, как минимум, подтверждение наличия делеции в локусе гена с помощью ПЦР с последующим секвенированием.
- Клеточный фенотип: В тексте отсутствует описание фенотипа клеток с делецией по ZMYND17. Критически важной информацией является то, влияла ли эта делеция на рост, пролиферацию, морфологию или жизнеспособность клеточной линии *in vitro*. Отсутствие видимого фенотипа само по себе является важным научным результатом, который, однако, требует своего обсуждения.
- Интерпретация результатов: Если делеция ZMYND17 не оказывала значительного влияния на пролиферацию клеток, возникает закономерный вопрос о том, насколько существенна регуляция, осуществляемая этим белком, для базовых функций митохондрий в использованной клеточной модели. Обсуждение этого аспекта, включая возможные причины устойчивости клеток (например, функциональная избыточность, активация альтернативных путей), углубило бы интерпретацию полученных данных.

2. Перспективы для установления прямого молекулярного механизма действия исследуемых белков. Проведенное исследование убедительно демонстрирует влияние белков SLIRP и PTCD2 на эффективность трансляции специфичных мРНК *in vivo*. Для дальнейшего укрепления выводов работы и перехода от корреляционных данных к установлению прямого причинно-следственного механизма, крайне перспективными представляются следующие эксперименты:

- Система трансляции *in vitro*: Разработка и использование реконструированной системы митохондриальной трансляции *in vitro* (или использование митопластов) с репортерными мРНК, несущими 5'-лидерные последовательности митохондриальных транскриптов, позволила бы напрямую доказать, что наблюдаемые эффекты обусловлены именно воздействием на трансляцию, а не на другие этапы экспрессии генов.

- Исследование связывания с РНК: Проведение экспериментов по анализу РНК-белковых взаимодействий позволило бы с высокой точностью идентифицировать сайты связывания белков PTCD2 и SLIRP на их мРНК-мишенях (*COIII* и мРНК субъединиц комплекса IV, соответственно). Это стало бы прямым доказательством их роли в качестве транскрипт-специфичных регуляторов.

3. Вопрос о компенсаторных механизмах при делеции нелетальных, но важных регуляторных белков. Полученные данные показывают, что делеции по генам *SLIRP*, *PTCD2* и *ZMYND17* не являются летальными для культивируемых клеток, несмотря на их важную роль в регуляции сборки ключевых дыхательных комплексов. Этот факт заслуживает отдельного внимания в разделе «Обсуждение».

- Было бы крайне ценно, если бы автор высказал предположения о возможных клеточных механизмах, компенсирующих отсутствие этих регуляторов.

Таковыми механизмами могли бы быть:

- Активность других, функционально перекрывающихся РНК-связывающих белков (например, других членов семейства PPR).
 - Активация систем контроля качества мРНК и белков.
 - Перестройка метаболизма клетки в сторону большего использования гликолиза.
- Обсуждение того, почему эволюция сохранила эти белки, если их функция может быть в определенной степени компенсирована, позволило бы перевести работу с клеточного на общеорганизменный уровень, связав полученные данные с данными на животных моделях, где нокаут некоторых из этих генов приводит к выраженным патологическим фенотипам.

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.

**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 Пиуновой У.Е. опубликованы в высокорейтинговых международных и российских 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 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. Диссертационное исследование оформлено, согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук 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:

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

09.11.2025

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

