

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

Идентификация и функциональная характеристика регуляторных белковых факторов митохондриальной трансляции является актуальной задачей современной биологии и медицины. Хотя митохондрии и унаследовали базовые системы от бактериальных предков, молекулярные механизмы органелл приобрели уникальные черты в результате адаптации к специфическим функциям и существованию в условиях окислительного стресса. В частности, это привело к принципиально иной, по сравнению с прокариотами, системе регуляции экспрессии генов, где доминирующим уровнем контроля становится этап трансляция. Более того, система регуляции приобретает исключительную сложность в связи с тем, что мультисубъединичные комплексы цепи окислительного фосфорилирования формируются из полипептидов, кодируемых как митохондриальным, так и ядерным геномами. Таким образом, сборка и функционирование дыхательной цепи требует не просто синхронной работы двух независимых систем экспрессии генов, но и поддержания строгого стехиометрического баланса между всеми компонентами, скоординированного импорта, а также соблюдения четкой пространственно-временной последовательности в процессе сборки в функциональные надмолекулярные структуры. В последние годы методы микроскопии высокого разрешения позволили идентифицировать некоторые особенности организации митохондриального трансляционного аппарата. Однако структурные данные требуют биохимической верификации и, что важнее, интеграции в целостную модель, описывающую многофакторную и адаптивную природу регуляции трансляции в митохондриях.

Широкая распространенность и гетерогенность митохондриальных заболеваний человека, которые могут иметь сходные фенотипические проявления при дефектах в разных генах, подчеркивают прямую практическую значимость фундаментальных исследований в этой области. Понимание молекулярных основ патогенеза, в частности, роли трансляционных регуляторов, мутации в которых напрямую связаны с развитием болезней, является необходимым условием для перехода к целевой диагностике и разработке стратегий терапии. Таким образом, изучение механизмов митохондриальной трансляции – это не только решение фундаментальной научной задачи, но и прямой путь к созданию инструментов для будущей персонализированной медицины.

Представленное диссертационное исследование Пиуновой У.Е. посвящено изучению роли белков ZMYND17, SLIRP и PTCD2 человека в тонкой регуляции митохондриальной трансляции. Хотя белок ZMYND17 человека известен как глобальный регулятор метаболизма, а его гомология с трансляционным активатором дрожжей Mss51 не вызывает сомнений, его конкретная молекулярная функция и фенотипы нокаута оставались неясными и спорными. Это противоречие усугублялось фундаментальным отличием систем: у млекопитающих митохондриальные мРНК лишены 5'-нетранслируемых областей, что ставило под вопрос саму возможность сохранения за ZMYND17 роли классического трансляционного активатора.

Согласно литературным данным, SLIRP известен как РНК-связывающий белок, функционирующий в стабильном комплексе с LRPPRC и участвующий в поддержании стабильности митохондриальных мРНК. При этом структурные исследования локализуют SLIRP в непосредственной близости от канала входа мРНК в малую субъединицу митоторибосомы, однако прямых экспериментальных доказательств его участия в регуляции трансляции до настоящего времени представлено не было. Традиционно PTCD2 рассматривается как классический представитель

семейства пентатрикопептидных белков, участвующий в процессинге митохондриальных транскриптов. Существующие представления о его функции основаны преимущественно на исследованиях с частичным нокаутом, приводящим к синтезу усеченной изоформы, что оставляло открытым вопрос о его возможной роли в других этапах экспрессии митохондриальных генов, в частности – в регуляции трансляции.

Диссертационная работа изложена на 115 страницах машинописного текста и имеет традиционную структуру, включающую следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Обсуждение, Заключение и Список литературы. Рукопись содержит 10 таблиц и 22 рисунка. Список цитированной литературы включает 146 источников.

Во введении к диссертационной работе дано развёрнутое обоснование актуальности научной проблемы, определены цель и задачи исследования, сформулированы положения, выносимые на защиту, и охарактеризованы основные методы исследования. Приведены также данные об апробации работы и публикационной активности автора.

Представленный обзор литературы является глубоким и не только демонстрирует отличное владение автором предметом исследования, но и обеспечивает содержательный переход к постановке целей и задач работы, логически подводя к представлению собственных результатов и их последующему обсуждению. В разделе качественно осмыслены и систематизированы современные данные, что позволяет рассматривать полученные результаты в общем контексте митохондриальной биологии.

Раздел «Результаты» выстроен логично и последовательно. Экспериментальные данные изложены ясно и подробно, представленные иллюстрации имеют высокое качество исполнения и снабжены исчерпывающими, понятными подписями, которые отражают суть представленных данных и позволяют самостоятельно оценить полученные результаты без обращения к основному тексту.

В разделе "Материалы и методы" все использованные методики изложены с достаточной степенью детализации, что подтверждает достоверность результатов и обеспечивает возможность воспроизведения экспериментов.

Методологическая основа исследования включает комплекс современных методов молекулярной биологии, биохимии, биоэнергетики и биоинформатики, что позволило всесторонне подойти к решению поставленных задач. Переходы между этапами исследования и избранными методами аргументированы эмпирическими данными и теоретическими положениями.

Статистическая обработка данных проведена корректно, с использованием соответствующих методов анализа. Количество независимых повторностей экспериментов является достаточным для обеспечения достоверности полученных результатов, что в совокупности с грамотной интерпретацией данных обеспечивает обоснованность выводов работы.

В разделе "Обсуждение" автор демонстрирует глубокую интеграцию полученных результатов с современными литературными данными. Предложены оригинальные модели регуляции митохондриальной трансляции и активности комплексов цепи окислительного фосфорилирования для каждого из исследуемых белков, которые находят подтверждение в экспериментальных данных.

Для каждого из исследуемых белков, ZMYND17, SLIRP и PTCD2, установлены ранее неизвестные функции и предложены механизмы их действия, которые в значительной степени пересматривают существовавшие представления.

В работе Пиуновой У. Е. впервые показано, что ZMYND17 не влияет на уровень трансляции COI, в отличие от дрожжевого ортолога, но участвует в посттрансляционных этапах сборки комплексов IV и V дыхательной цепи.

Эволюционный анализ выявил значительную структурную дивергенцию между ZMYND17 и Mss51, что объясняет приобретение новых регуляторных функций исследуемого белка у млекопитающих.

Что касается белка SLIRP, полученные данные не только убедительно подтверждают структурные наблюдения, позиционирующие его у входного туннеля малой рибосомной субъединицы, но и впервые раскрывают функциональный смысл этой локализации. Экспериментально установлено, что SLIRP специфически регулирует инициацию трансляции мРНК, кодирующих субъединицы цитохром с оксидазы (COI, COII, COIII). Комплексный анализ митохондриальных функций выявил согласованную картину: снижение дыхательной активности и нарушение сборки комплексов I и IV дыхательной цепи, что полностью соответствует наблюдаемому дефекту трансляции их митохондриально кодируемых субъединиц и согласуется с данными литературы о фенотипе, ассоциированном с мутациями SLIRP у человека. На основании выявленной ассоциации белка исключительно с малой субъединицей миторибосомы и транскрипт-специфичного эффекта нокаута автором предложена убедительная гипотеза, согласно которой SLIRP действует на пре-инициаторном этапе, способствуя релаксации вторичных структур мРНК и повышая локальную концентрацию специфических транскриптов в области рибосомального сайта связывания. Этот механизм объясняет, каким образом может достигаться избирательная регуляция трансляции в системе, лишенной классических 5'-UTR. Полученные результаты открывают новые перспективы для понимания принципов регуляции митохондриальной трансляции у млекопитающих.

В случае белка PTCD2 автором впервые на модели полного нокаута продемонстрирована его ключевая роль в трансляции мРНК, кодирующей субъединицу COIII цитохром с оксидазы. Полученные данные выявили согласованную картину нарушений митохондриальных функций: резкое снижение дыхательной активности, нарушение сборки комплекса IV и

дестабилизацию надмолекулярной организации дыхательной цепи, что объясняется критической зависимостью биогенеза цитохром с оксидазы от синтеза COIII. Установленная ассоциация PTCD2 с ассоциированными 55S рибосомами указывает на его участие в поздних этапах инициации трансляции. На основании этих результатов предложена модель, в которой PTCD2 функционирует как транскрипт-специфичный регулятор, обеспечивающий эффективный синтез COIII, что представляет собой второй известный пример такого механизма у млекопитающих после белка TACO1 и существенно расширяет современные представления о регуляции митохондриальной трансляции.

Таким образом, проведенное исследование вносит существенный вклад в понимание молекулярных механизмов регуляции митохондриальной трансляции у млекопитающих. Полученные данные убедительно демонстрируют уникальные функции белков ZMYND17, SLIRP и PTCD2 в организации этого процесса. Обоснованность экспериментальных подходов, верификация и интерпретация результатов работы не вызывают сомнения в их достоверности. Кроме того, работа открывает новые перспективы для изучения не только фундаментальных принципов работы митохондрий, но и молекулярных основ связанных с дисфункцией патологических состояний. Диссертационная работа производит благоприятное впечатление, отличается целостностью и логической завершенностью.

Вместе с тем, следует отметить ряд частных недочетов, допущенных автором при оформлении и изложении материалов:

1. п.4.1. Подтверждалась ли моноклональность полученной линии клеток HeLa с делецией в гене *ZMYND17*, если - да, то каким методом?
2. п.4.2. Проводилась ли нормализация по концентрации общего белка перед электрофоретическим разделением радиоактивно меченных митохондриальных полипептидов?

3. Рисунок 3. Было бы полезно привести некоторые данные по статистической обработке результатов (например, используемые критерии, p-value).
4. п.4.7. вопрос идентичен как для п.4.1.
5. с.92. Автор пишет, что анализ интерактома был проведен с помощью ко-иммунопреципитации с последующей масс-спектрометрией. Осталось неясным, почему используется слово «иммуно». Ни в этом разделе, ни в разделе 3.18.1 «Материалов и методов» не удалось найти упоминания об использовании в данном эксперименте антител.
6. В разделе 4.17, на мой взгляд, не хватает таблицы с идентифицированными митохондриальными рибосомальными белками, которые показали статистически значимое обогащение.

Следует подчеркнуть, что указанные недочеты имеют в основном технический и стилистический характер и не умаляют общей научной значимости полученных результатов и качества их изложения. 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:

доктор биологических наук,

Заместитель генерального директора по научной работе

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства»
(ФГБУ ФНКЦ ФХМ им.Ю.М.Лопухина ФМБА России)

Лазарев Василий Николаевич

29.10.2025

Контактные данные:

тел.: 7(916)635-24-55, e-mail: lazarev@rcpcm.org

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

03.01.03 – Молекулярная биология

Адрес места работы:

119435, Россия, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1А,

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им.Ю.М.Лопухина ФМБА России

Тел.: +7 (499) 245-04-71; e-mail: lazarev@rcpcm.org

Подпись сотрудника ФГБУ ФНКЦ ФХМ им.Ю.М.Лопухина ФМБА России

Лазарева Василия Николаевича

удостоверяю: *Ученый секрет*
им. Ю.М. Лопухина

29.10.2025 *Кострокова Е. П.*