

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертацию Андреева Дмитрия Евгеньевича “Роль 5’ нетранслируемых областей мРНК в регуляции синтеза белка у млекопитающих”, представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальностям 02.00.10 – биоорганическая химия и 03.01.03 – молекулярная биология

Синтез белка на рибосомах, трансляция, является основополагающим клеточным процессом. в котором генетическая информация, закодированная в виде последовательности нуклеотидов в генах и скопированная в виде матричных РНК, преобразуется в последовательность аминокислот в полипептидах, формирующих новые белки. На сегодняшний день изучение всех аспектов этого процесса остаётся чрезвычайно важным для развития наук о жизни, поскольку понимание тонкостей механизма этого процесса всё ещё не достигнуто. Актуальность работ в этом направлении связана как с развитием фундаментальной науки, поскольку данный процесс является единым для всех живых организмов, так и с необходимостью поиска путей противодействия развитию различных заболеваний вирусной природы, поскольку многие вирусы смогли приспособить свой генетический аппарат для паразитирования на трансляционном аппарате клеток. Известно, что биосинтез белка подвержен строгой регуляции, и ведущую роль в этой регуляции отводят специальным функциональным районам в мРНК – 5’-нетранслируемым областям (5’-НТО). В частности, некоторые клеточные мРНК за счет специфических элементов в 5’-НТО способны эффективно транслироваться в условиях подавления основного белкового синтеза, а вирусы часто используют особые элементы в 5’-НТО своих геномных мРНК для того, чтобы переключить клеточный трансляционный аппарат на синтез вирусных белков. В этой связи диссертационная работа Андреева Д.Е., посвящённая изучению особенностей 5’-НТО мРНК млекопитающих и вирусных РНК, непосредственно обеспечивающих регуляцию белкового синтеза, является, безусловно, актуальной и важной для развития данной области науки.

Диссертация изложена на 210 страницах и содержит 73 рисунка. Сама работа построена классическим образом и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы» из 283 источников и «Благодарности». Во «Введении» кратко изложены актуальность исследуемой проблемы, цель и задачи исследования,

научная новизна и практическая значимость работы, а также использованная в работе методология. Здесь же даны основные положения, выносимые на защиту, и приведена информация об апробации работы, количестве публикаций и личном вкладе автора.

В обзоре литературы автор даёт описание современного состояния знаний о механизме и участниках инициации трансляции у эукариот, принципах её регуляции, и знакомит читателя с терминологией, используемой специалистами в данной области. Первый раздел этой главы посвящён рассмотрению механизма классической инициации трансляции у эукариот, и хотя этот раздел и озаглавлен «Трансляционный аппарат млекопитающих», речь в нём идёт именно об аппарате инициации трансляции, тогда как механизмы элонгации и терминирования трансляции не затронуты. Далее автор переходит к рассмотрению свойств 5'-НТО клеточных мРНК и вариантов их влияния на эффективность инициации трансляции. В этой части обзора автор приводит известные факты влияния вторичной структуры 5'-НТО на инициацию, описывает примеры вовлечения РНК-связывающих белков, имеющих мишени в 5'-НТО различных мРНК, в регуляцию трансляции этих мРНК, и указывает на роль коротких рамок считывания в регуляции трансляции при стрессе. Существенная часть обзора отведена рассмотрению влияния дис-действующих элементов в 3'-НТО мРНК на инициацию трансляции. Из этой части становится понятно, что молекулярные события, происходящие в области мРНК, располагающейся после её кодирующей части, теснейшим образом связаны с инициацией трансляции, а структурные элементы в 3'-НТО мРНК и белки, связывающиеся с ними, непосредственно влияют на процессы, протекающие при формировании прединициаторного комплекса. Не забыт в обзоре и эпигенетический путь контроля регуляции трансляции, хотя знания в этом направлении остаются скудными. В заключительной части обзора даётся представление о механизмах процесса внутренней инициации трансляции, характерного для многих вирусов, и содержится классификация IRES-элементов – участков внутренней инициации трансляции вирусных РНК. Данная часть важна для понимания проблемы внутренней инициации на клеточных мРНК, обсуждению которой посвящен раздел в главе «Результаты» данной работы. Завершает обзор раздел, знакомящий с новым инструментом для изучения трансляционного контроля – рибосомный профайлинг. Однако места в обзоре ему уделено менее страницы, что для неискушённого читателя слишком мало.

В целом, обзор литературы достаточно информативен, легко читается и даёт представление о проблематике диссертационной работы, однако он не свободен от недочётов. В частности, в ряде случаев в тексте отсутствуют ссылки на рисунки, одновременно используется русско- и англоязычное обозначение одних и тех же терминов

(напр., ГТФ и GTP), не раскрыто сокращение GAIT, а также присутствуют кальки с английского (напр., в названии раздела 1.3.6.), которые несколько затрудняют восприятие материала. Также следует отметить, что в описании механизма инициации трансляции с участием IRES-элементов типа III не раскрыта функциональная роль субдомена III_d в их структурах, критически важного для взаимодействия IRES-элементов этой группы с 40S субчастицей рибосомы.

Глава «Материалы и методы исследования» содержит подробное и обстоятельное описание экспериментальных методов, использованных автором в работе. В качестве отдельных разделов структурированы перечни реактивов, олигонуклеотидов, антител и составов буферных растворов, использованных в приведённых методиках. Все методики описаны довольно подробно, что позволяет их воспроизвести или использовать в качестве лабораторного протокола. К сожалению, раздел 2.5 «Методы» не содержит подразделов, что не позволяет с лёгкостью ориентироваться в перечне методик.

Глава «Результаты и обсуждение» разделена на три большие части, в каждой из которых автор излагает результаты своих исследований. В первой части представлены результаты исследования особенностей инициации трансляции на IRES-элементах I-го и II-го типов. Сначала автор изучает влияние факторов инициации трансляции на выбор альтернативных стартовых кодонов в мРНК вируса FMDV и убедительно показывает, что фактор eIF1 участвует в селекции кодонов, подавляя инициацию с первого старт-кодона и стимулируя инициацию на втором. Далее, с использованием разработанного автором метода «кинетического тоупринтинга» (который здесь он почему-то именует «ту-принтингом») в бесклеточной белок-синтезирующей системе, собранной на основе лизата ретикулоцитов кролика, он исследует скорость формирования инициаторных комплексов на первом и втором старт-кодонах мРНК FMDV и показывает, что они формируются медленнее, чем на экспонированной β-глобиновой мРНК. На основании этих данных автор делает заключение, что инициация трансляции на IRES-элементе FMDV проходит значительно медленнее, чем кэп-зависимая трансляция. С этим, однако, можно было бы поспорить. Во-первых, чтобы делать такое заключение, одного примера экспонированной мРНК явно не достаточно, а во-вторых, β-глобиновая мРНК здесь служит не вполне объективным контролем, поскольку она является основной для ретикулоцитов кролика, и система трансляции в ретикулоцитах может быть оптимизирована под её эффективную трансляцию. Во втором разделе первой части главы «Результаты и обсуждение» автор описывает открытие неожиданной роли глицил-тРНК-синтетазы как транс-действующего фактора, стимулирующего трансляцию на IRES-элементах I-ой группы. Эта часть работы, на мой взгляд, одна из наиболее интересных в диссертации. В ней приводятся строгие

доказательства того, что домен V IRES-элемента полиовируса мимикрирует под глициловую тРНК, за счёт чего обеспечивается связывание глицил-тРНК-синтетазы с IRES-элементом вируса, которое стимулирует формирование 48S инициаторного комплекса. У меня только одно замечание к этой части: автор приводит данные того, что мутация в петле домена V IRES-элемента нарушает трансляцию репортёрной мРНК, однако что это была за мутация – умалчивает.

Вторую часть главы 3 автор отводит изучению кэп-независимой трансляции у эукариот. Значительное место в ней уделено критике использования бицистронных репортёрных конструкций в изучении внутренней инициации трансляции на различных мРНК. Автор приводит несколько доводов, почему использование подхода, основанного на трансфекции клеток плазмидной ДНК, кодирующий бицистронный РНК-транскрипт, может привести к ошибочной интерпретации результатов. В принципе, со всеми доводами можно согласиться за исключением того, что автор полагает неэффективной трансфекцию неделящихся клеток плазмидной ДНК, поскольку, по его мнению, для попадания плазмиды в ядро необходимо исчезновение ядерной оболочки клетки при делении. На мой взгляд, в литературе можно найти множество примеров того, что эффективность трансфекции многих линий клеток на стадии 70% конфлюэнтности плазмидами, кодирующими флуоресцентные белки, может достигать 95%, и это находится в противоречии с приведённым выше суждением автора. Однако это не умаляет значения результатов его дальнейших экспериментов, в которых он блестяще демонстрирует преимущества метода мРНК-трансфекции. Именно этот метод позволил ему обнаружить энхансеры кэп-независимой трансляции мРНК и выдвинуть прорывную гипотезу о стимуляции кэп-независимой инициации трансляции некоторых мРНК млекопитающих через активацию энхансеров в 5'-НТО этих мРНК.

Результаты работы, представленные в третьей, заключительной, части главы 3 получены автором с применением новейшего метода рибосомного профайлинга, основанного на высокопроизводительном секвенировании фрагментов мРНК, защищаемых рибосомой от разрезания рибонуклеазами. Эта часть содержит четыре раздела, которые имеют логическую связь, и в которых автор последовательно излагает полученные данные. Сначала он изучает инициацию трансляции на не-AUG кодах, затем описывает изменения в выборе стартовых кодонов, наблюдаемые при кислородно-глюкозном голодании, проводит анализ 5'-НТО мРНК факторов инициации трансляции у млекопитающих и в завершении исследует роль 5'-НТО в регуляции трансляции при фосфорилировании фактора eIF2. В итоге, по результатам работы автором сформулированы три вывода, касающиеся особенностей структуры 5'-НТО отдельных

мРНК, позволяющих эффективно промотировать инициацию трансляции с не-AUG кодонов, и определяющей роли uORF в регуляции трансляции при подавлении белкового синтеза посредством фосфорилирования фактора eIF2 при стрессе. У меня только два замечания по этому разделу. Первое касается представления результатов. Обычно результатом рибосомного профайлинга является большой массив данных, которые для наглядности можно оформить в виде рисунков и схем (что в работе сделано великолепно), но не следует пренебрегать также таблицами, которые более строго представляют количественную информацию. Другое замечание касается утверждения автора на стр. 152 о том, что Met-tRNA_i может доставляться на рибосому eIF2-независимым способом, по крайней мере, в случае IRES-элементов III группы. Если я правильно понял, то речь здесь идёт о ситуации в живой клетке, и тогда эта фраза требует пояснения или ссылки.

В разделе «Заключение» автор кратко суммирует свои достижения в контексте современных знаний и представлений, касающихся роли 5'-НТО в регуляции инициации трансляции у млекопитающих. Это помогает по достоинству оценить полученные автором результаты.

Раздел «Выводы» содержит 6 умозаключений автора, сделанных на основе исследований, представленных в диссертации. Выводы достаточно лаконичны и конкретны, хотя, на мой взгляд, их следовало бы пронумеровать и раскрыть сокращения, поскольку это самостоятельный раздел диссертации.

Отмеченные недостатки, конечно, не носят принципиального характера, не портят общего хорошего впечатления от представленной работы и никоим образом не влияют на её основные результаты и выводы. Все результаты имеют высокую актуальность, фундаментальную значимость и научную новизну. Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена в 16 научных статьях, опубликованных автором в высокорейтинговых российских и зарубежных журналах, и в большинстве этих статей он является первым или последним автором. Результаты работы доложены на отечественных и международных конференциях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Всё вышеизложенное позволяет заключить, что диссертация Дмитрия Евгеньевича Андреева «Роль 5' нетранслируемых областей мРНК в регуляции синтеза белка у млекопитающих», является законченным научным достижением, в котором автором решена крупная научная проблема, и отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к диссертационным работам на соискание ученой степени доктора наук. Содержание

диссертации соответствует паспортам специальностей 02.00.10 – «Биоорганическая химия» и 03.01.03 – «Молекулярная биология», а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Работа оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Считаю, что соискатель Андреев Дмитрий Евгеньевич заслуживает присуждения ученой степени доктора химических наук по специальностям 02.00.10 – «Биоорганическая химия» и 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Официальный оппонент,

ведущий научный сотрудник

Лаборатории структуры и функции рибосом
ИХБФМ СО РАН

д.х.н., доц.



11 декабря 2019 г.

Малыгин Алексей Аркадьевич

Адрес: Институт химической биологии и фундаментальной медицины

Сибирского отделения Российской академии наук,

пр. Лаврентьева 8, г. Новосибирск, 630090

Тел.: +7-(383)-363-51-39

E.mail: malygin@niboch.nsc.ru

Подпись Малыгина Алексея Аркадьевича удостоверяю



И.В. Хасанова