

**Отзыв научного руководителя на диссертационную работу
Макеевой Десиславы Станимировны
«Функциональные особенности трансляционных
факторов eIF2D/TMA64, MCT-1/TMA20 и DENR/TMA22»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология**

Десислава Станимировна Макеева работает под моим руководством с весны 2013 года и за это время успела поучаствовать в выполнении нескольких успешных научных проектов. Основной темой её работы стало изучение функции трансляционных факторов eIF2D/TMA64, MCT-1/TMA20 и DENR/TMA22 в дрожжах *S.cerevisiae* и в клетках млекопитающих.

На момент начала работы биохимическая активность данных белков была достаточно подробно охарактеризована *in vitro*, в системе реконструкции трансляционных комплексов из очищенных компонентов. В этой искусственной системе в одних случаях белки были способны стабилизировать комплекс рибосомы с тРНК, находящейся в Р-сайте (могли участвовать в неканонической инициации трансляции на определённых мРНК), однако в других условиях приводили, наоборот, к разборке рибосомного комплекса, обеспечивая рециклинг. Один из факторов, MCT-1, были также известен как онкобелок, повышенное содержание которого в клетках способно приводить к возникновению лимфом. Однако связь между биохимической активностью, проявляемой в системе *in vitro*, и функциями данных белков в живых клетках была неизвестна. Дополнительная сложность была связана с тем, что функции eIF2D и его гомологов, MCT-1 и DENR, могли частично перекрываться, что усложняло функциональный анализ на клетках с помощью молекулярно-генетических подходов.

В ходе работы Макеевой Д.С. удалось применить недавно появившийся метод рибосомного профайлинга к дрожжевым штаммам, в которых одновременно отсутствовали белки TMA64 (дрожжевой ортолог eIF2D) и TMA20 (MCT-1). Надо отметить, что и вся «дрожжевая кухня», и методика рибосомного профайлинга дрожжевых штаммов были «поставлены» в лаборатории именно Десиславой (насколько мне известно, она вообще была

первой, кто успешно применил эту непростую методику целиком на территории нашей страны). В результате были найдены определённые нарушения экспрессии генов в клетках мутантных штаммов, которые сузили диапазон поиска функций белков и объяснили некоторые дефекты, присущие мутантам, однако однозначно ответить на вопрос о роли факторов в дрожжевой клетке на этом этапе не получилось.

Тогда было принято решение изменить направление поисков и попробовать найти ответы с помощью бесклеточной системы трансляции на основе тех же дрожжевых штаммов. Десислава сумела самостоятельно наладить получение бесклеточных трансляционных систем из клеток дрожжей и с помощью набора репортерных конструкций показала, что отсутствие данных факторов в клеточном лизате приводит к резкому увеличению частоты реинициации трансляции в случае мРНК, содержащих более одной рамки считывания (в частности, мРНК с короткими вышерасположенными рамками считывания, uORF). Этот дефект можно было исправить путём добавления в систему рекомбинантных белков eIF2D или димера MCT-1/DENR (дрожжевых или человеческих).

Примерно в это же время в журнале «*Nature*» вышла статья о возможном участии факторов MCT-1 и DENR в реинициации (но без механистического объяснения этого явления). Это сильно подогрело интерес мирового научного сообщества к данным белкам. В лаборатории наших партнёров из Национального института здоровья (США), специализирующихся на изучении молекулярных механизмов биосинтеза белка в дрожжах, был проведён повторный анализ тех же штаммов методом рибосомного профайлинга, однако в этом случае был применён усовершенствованный протокол (поскольку в тому времени стало известно, что классическая методика, которой ранее пользовалась Десислава, не позволяет увидеть локальные пики рибосомной плотности на мРНК). Коллегам удалось увидеть пик плотности рибосом на метагенном профиле на расстоянии, соответствующем «полутора рибосомам» до стоп-кодона – это могло говорить о проблемах с рециклингом 40S субчастицы в данных штаммах. Эти данные прекрасно согласовывались с полученными ранее результатами Десиславы о повышенной частоте реинициации, поскольку

такая реинициация как раз могла быть закономерным следствием неадекватной задержки рибосомы на мРНК после терминации. В результате объединения усилий двум нашим коллективам удалось разработать концепцию, раскрывающую роль данных белков в живой клетке. Согласно этой модели, белки проявляют свою функцию на стадии, когда малая субчастица рибосомы, оставшаяся связанной с мРНК после терминации трансляции и отсоединения большой субчастицы, «принимает решение», покинуть ей данную мРНК (рециклинг) или возобновить сканирование (что приведёт к реинициации трансляции нижерасположенной рамки считывания). «Неправильные решения» в данном случае чреваты нарушениями трансляции большого количества клеточных мРНК – прежде всего тех, которые содержат в 5'-нетранслируемых областях регуляторные uORF. Эта работа в 2018 году была опубликована в высокорейтинговом журнале *Mol Cell*.

Десислава же продолжила изучать полюбившиеся белки, но теперь уже на клетках млекопитающих. Ей удалось показать, что при окислительном стрессе, индуцируемом арсенитом натрия, белки eIF2D, MCT-1 и DENR, а также ещё один фактор рибосомного рециклинга, ABCE1, перенаправляются в стресс-гранулы, что сопровождается увеличением частоты реинициации при трансляции uORF-содержащих мРНК в цитозоле. Она также принимала активное участие в ещё одной работе, посвящённой изучению особенностей регуляции трансляции мРНК, кодирующей eIF2D человека.

Таким образом, Макеевой Д.С. было получено большое количество оригинальных научных результатов, сыгравших решающую роль в раскрытии функциональных особенностей трансляционных факторов eIF2D/TMA64, MCT-1/TMA20 и DENR/TMA22, что важно как для лучшего понимания фундаментальных аспектов механизмов биосинтеза белка в клетках эукариот, так и для поиска способов борьбы с заболеваниями человека. В ходе работы докторант продемонстрировала навыки, характеризующие её как сложившегося самостоятельного исследователя. Помимо научной деятельности, Десислава также успешно ведёт педагогическую работу в рамках практикума по генной инженерии на

факультете биоинженерии и биоинформатики МГУ и является научным руководителем студенческих курсовых работ.

Основные положения и выводы диссертационного исследования изложены в трех статьях, опубликованных в международных научных журналах, индексируемых в базе данных Web of Science.

Диссертация соответствует критериям, определенным в Положении о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Всё вышесказанное позволяет рекомендовать Макееву Десиславу Станимировну для присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
отдела взаимодействия вирусов с клеткой
Научно-исследовательского института
физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского МГУ,
доцент факультета биоинженерии и биоинформатики МГУ



митриев Сергей Евгеньевич

