

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертацию Макеевой Десиславы Станимировны на соискание ученой
степени кандидата биологических наук на тему: «Функциональные
особенности трансляционных факторов eIF2D/TMA64, MCT-1/TMA20 и
DENR/TMA22» по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»

Биосинтез белка с момента первого описания и по сей день вызывает неослабевающий интерес ученых. В молекулярной биологии трансляцию можно считать процессом-рекордсменом по длительности непрерывного периода получения выдающихся научных результатов, поскольку, начиная с 70-х годов прошлого столетия, не проходит и года, в котором не было бы совершено какого-либо значимого открытия в этой области. Это объясняется невероятной сложностью процесса биосинтеза белка, в который вовлечено громадное количество белков (и с каждым годом их описывается все больше и больше), не говоря о рибосоме – самой сложноорганизованной молекулярной машине в живой природе.

Диссертационная работа Десиславы Станимировны Макеевой вносит немалый вклад в поддержание общемирового высокого уровня исследований трансляции. Она посвящена неканоническим факторам инициации, а точнее – их роли в крайне любопытном процессе реинициации синтеза белка эукариотическими рибосомами. Этот феномен, у прокариот являющийся обыденным механизмом работы трансляционного аппарата, у эукариот был описан сравнительно недавно и заключается в способности рибосомы, закончив трансляцию короткой регуляторной открытой рамки считывания, расположенной на 5'-конце мРНК, «переехать» по мРНК на стартовый кодон основной рамки считывания, не диссоциируя полностью от матрицы. Механизмы данного процесса были практически не исследованы, но Десислава Станимировна в своей работе в значительной степени закрасила данное белое пятно на карте наших знаний о биосинтезе белка.

Диссертационная работа Десиславы Станимировны построена по стандартному плану и содержит все разделы, наличия которых принято ожидать в подобных работах. Позволю себе, не останавливаясь на списке сокращений, перейти к разделу «Введение» и заявить, что он в целом выполняет свою функцию, то есть вводит читателя работы в курс дела и дает ему возможность понять, зачем, собственно, задумывалась данная работа. В качестве придирки могу констатировать, что одна из целей работы, размещенных Десиславой Станимировной сразу после раздела «Введение», а именно исследование регуляции трансляции мРНК eIF2D, никак логически не связана с введением к работе. Однако же обоснованность этой цели становится совершенно ясной после прочтения раздела «Обзор литературы», к анализу какового я и перехожу.

Работа Десиславы Станимировны посвящена факторам трансляции человека eIF2D и MCT1/DENR, а также их дрожжевым ортологам Tma64p и Tma20p/Tma22p. Соответственно, в обзоре литературы, помимо кратких сведений о трансляции в целом, автор концентрируется на вышеупомянутых белках (причем не только из клеток человека и дрожжей, но и из других организмов) и суммирует буквально всю имеющуюся в их отношении информацию, благо белки эти изучены слабо и информации не очень много. Десислава Станимировна очень достойно справилась с обзором научной литературы на тему ее диссертации. Довольно-таки отрывочные сведения о вышеперечисленных белках и об их функциях в клетках различных эукариотических организмов прекрасно систематизированы, а отдельные работы, посвященные этим белкам, даже подвергаются критическому анализу. Это довольно редко можно встретить в диссертациях на соискание ученой степени кандидата наук, тем более что подобный анализ проводится автором на очень высоком уровне. При этом у меня не возникло подозрений, что вместо Десиславы Станимировны это сделал ее научный руководитель: текст обзора литературы (да и вообще всей работы) изобилует характерными для молодых исследователей стилистическими ошибками и неточными использованиеми

терминов. В качестве примеров приведу «гидролиз пептидил-тРНК связи» (стр.12) и излюбленное Десиславой Станимировной словосочетание «тройной комплекс» (стр.13 и далее везде по тексту), под которым она, собственно говоря, понимает комплекс тройственный. Тем не менее, в данном случае плюсы подобных отклонений от норм русского научного и литературного языка даже перевешивают их минусы, поскольку именно они дают читателю возможность убедиться, что работа (и, в частности, раздел «Обзор литературы») – плод собственных усилий автора, а это в случае диссертационного труда гораздо важнее любых литературных достоинств.

Раздел «Материалы и методы» с самого начала привлекает внимание читателя названием первого подраздела: «Культивирование культур клеток млекопитающих». Однако же больше в данном разделе, по сути, придраться не к чему. Он написан практически с идеальным соблюдением баланса между возможностью технического воспроизведения экспериментов автора и отсутствием излишних методологических подробностей. На мой взгляд, именно так и должен выглядеть раздел «Методы» квалификационной диссертационной работы. При этом должен отметить, что арсенал методов, примененных Десиславой Станимировной в своей работе, очень широк – от классических генно-инженерных подходов до рибосомного профайлинга и иммуноцитохимии. Единственный негативный момент, который бы еще хотелось отметить – это отсутствие информации об использованных в работе штаммах дрожжей, вплоть до того, что неясно, как были получены штаммы-делетанты по генам семейства ТМА.

Описание раздела «Результаты и обсуждение», по всей видимости, будет самым объемным, что неудивительно, поскольку данный раздел в любой квалификационной работе является и самым важным, и самым интересным, и (вследствие этого) вызывающим больше всего вопросов. Не стала исключением и работа Десиславы Станимировны. За раздел «Результаты и обсуждение» я хотел бы похвалить ее отдельно, поскольку в нем четко прослеживается важнейшая часть любой научной работы – логика перехода от эксперимента к

эксперименту и постановка конкретных экспериментальных вопросов с получением четких ответов на них. Десислава Станимировна еще в обзоре литературы убедительно показала, что белки Tma64p, Tma20p и Tma22p каким-то образом связаны с процессом трансляции, причем их функция, скорее всего, проявляется на этапе инициации. Чтобы прояснить роль этих белков, автор использовал метод рибосомного профайлинга, позволяющий оценить плотность покрытия рибосомами каждой конкретной клеточной мРНК. Для этого эксперимента использовались те самые штаммы-делетанты по генам семейства ТМА, происхождение которых окутано тайной. Тем не менее, Десислава Станимировна зарегистрировала несколько случаев изменения трансляции конкретных дрожжевых мРНК, причем все они указывали на возможную роль ТМА-белков в процессе реинициации трансляции. К подтверждению такой возможности она и перешла путем постановки соответствующих экспериментов по трансляции искусственных матриц *in vitro*. Эксперименты были задуманы, с одной стороны, изящно, а с другой – четко и с наличием всех необходимых контролей, что не могло не привести к получению интересных и достоверных результатов. Так оно и вышло: Десислава Станимировна убедительно показала, что ТМА-белки дрожжей, а также их человеческие ортологи, блокируют реинициацию трансляции на мРНК, содержащих короткие открытые рамки считывания перед основной рамкой. В конце данной части раздела Десислава Станимировна обсуждает полученные результаты и предлагает несколько механистических моделей действия ТМА-белков.

После этого автор обращает внимание на так называемые стрессовые гранулы, формирующиеся в эукариотической клетке в ответ на окислительный стресс. Известно, что в клетках человека в этих гранулах содержится большое количество факторов инициации трансляции, в том числе и eIF2D – один из основных объектов работы. Десислава Станимировна продемонстрировала, что и другие факторы реинициации клеток человека, а именно MCT1 и DENR, входят в состав стрессовых гранул после индукции стресса, а также что это

сопряжено с усилением трансляции мРНК, содержащие короткие рамки считывания. Таким образом, крайне вероятным является работа обсуждаемых белков в качестве регуляторов трансляции в условиях стресса. Более того, оказалось, что трансляция мРНК eIF2D подавляется в условиях стресса, причем именно благодаря ослаблению реинициации – данная мРНК также содержит короткую рамку считывания, предшествующую основной. Этот факт подтверждает предположение Десиславы Станимировны о важной роли данного белка в качестве регулятора трансляции в условиях стресса: его пониженные количества в данных условиях приводят к тому, что усиливается трансляция отдельных мРНК, которые вполне могут кодировать белки, важные именно в стрессовых условиях.

В связи с удивительно четким и ясным построением экспериментальной части работы у меня почти нет ни вопросов, ни замечаний к этой части. Однако полное отсутствие вопросов к результатам квалификационной работы в отзыве оппонента ставит под сомнение его собственную квалификацию, и чтобы избежать формирования такого нелестного мнения обо мне, я все же хочу отметить два момента. Во-первых, для меня остался неясен выбор штаммов-делетантов для проведения экспериментов. Если говорить точнее, я не понял, почему Десислава Станимировна не использовала в работе штаммы *Δtma22* и *Atma20Δtma22*. Мне кажется, что включение данных штаммов в анализ привел бы к получению результатов, которые можно было бы интерпретировать еще более четко, чем это делается в работе. Во-вторых, очень жалко, что Десислава Станимировна, анализируя трансляцию мРНК МАТа2 и предположив биосинтез пептида Mata2-2 в отсутствие исследуемых белков, не проверила данное предположение при помощи Вестерн-блоттинга. Мне кажется, что этот эксперимент стал бы очень красивым «бантиком» данной части работы, хотя следует признать, что, как говорится, оно и так неплохо вышло.

В заключение отмечаю, что избранная Десиславой Станимировной тема диссертационной работы безусловно актуальна, степень обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, очень

высока, а полученные автором данные характеризуются несомненной достоверностью и новизной. Высказанные мной замечания не умаляют значимости диссертационного исследования, поскольку являются частными. Работа Десиславы Станимировны отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 03.01.03 – «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. Работа оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Считаю, что соискатель Макеева Десислава Станимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент, доктор биологических наук, профессор кафедры молекулярной биологии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Каменский Петр Андреевич

Контактные данные:

тел.: 8 (495) 939-54-85, e-mail: peter@protein.bio.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:
03.01.03 – Молекулярная биология

Адрес места работы:

119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Тел.: 8 (495) 939-27-76; e-mail: info@mail.bio.msu

Подпись профессора биологического факультета МГУ П.
Ученый секретарь биологического факультета МГУ

ряю:

Е.В.Петрова