

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу на соискание ученой степени кандидата биологических наук Лашкевич Ксении Александровны на тему: «Изучение пространственной и временной регуляции трансляции усовершенствованными методами мРНК -трансфекции» по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

Актуальность диссертационного исследования

Трансляция, или биосинтез белка – один из жизненно важных процессов в клетке, реализующий генетическую информацию. Регуляция экспрессии генов на уровне трансляции играет важную роль в различных клеточных процессах как в норме, так и в ответ на стрессовые воздействия. Изучение такой регуляции и лежащих в её основе механизмов является важнейшим вопросом фундаментальных исследований, а также имеет большое значение для клинической практики, поскольку позволяет разрабатывать новые методы борьбы со многими заболеваниями, в том числе с онкологическими.

Диссертационная работа К.А.Лашкевич представляет собой серьезную попытку исследовать пространственную и временную регуляцию трансляции в эукариотических клетках в стрессовых условиях, а также выяснить некоторые особенности действия некоторых антибиотиков на эукариотические клетки. Несмотря на имеющиеся подвижки в изучении вышеуказанной проблемы, многое остается непонятным и противоречивым. Кроме того, и адекватных методов для решения возникающих задач очень мало, в связи с чем работа К.А.Лашкевич является не только актуальной, но и в своем роде передовой, поскольку в ней предлагается использовать новые методические подходы.

Структура работы

Материал диссертации изложен на 138 страницах машинописного текста, включает в себя 44 рисунка и 3 таблицы. Диссертационная работа написана в соответствии с требованиями к оформлению работ и включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Список литературы включает 168 источников.

Научная новизна и практическая значимость работы

Диссертационная работа дает полное представление о проведенных исследованиях и позволяет отметить сильные стороны работы: четкую постановку и масштабность решаемых задач, оптимальные для их решения экспериментальные подходы, уникальные экспериментальные данные и их грамотную интерпретацию.

В ходе выполнения диссертационной работы был разработан ряд новых экспериментальных подходов к изучению трансляции, включая метод краткосрочной мРНК-трансфекции, а также методология длительного измерения активности репортёрной мРНК в живых клетках. Новые методические подходы были применены к изучению трансляции большого набора репортёрных мРНК, включая мРНК с различными механизмами инициации трансляции, и позволили выявить дифференциальные эффекты в ответ на стрессовые условия, в том числе ранее не описанные в литературе.

Впервые были описаны трансляционные свойства безлидерной мРНК в культивируемых клетках высших эукариот и показана ее устойчивая трансляция в условиях стрессов разной природы интенсивности, при которых трансляция репортёрной мРНК с классическим кэп-зависимым клеточным лидером значительно ингибировалась или даже полностью подавлялась.

Показано, что антибиотик амикумацин А ингибирует элонгацию трансляции репортёрных мРНК в клетках эукариот, что может быть использовано в дальнейшем для разработки нового противоопухолевого препарата. Для другого рибосомного ингибитора, бластицидина S, показана активность ингибировать трансляцию у эукариот преимущественно на стадии элонгации. Метод мРНК-трансфекции впервые применен для оценки влияния локализации мРНК на ее трансляцию. Выявлены дифференциальные трансляционные эффекты репортёрных мРНК с разной локализацией трансляции в ответ на некоторые виды клеточных стрессов.

Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов

Положения, сформулированные в диссертации, основаны на большом объеме фактического материала, выводы полностью обоснованы совокупностью приведенных данных, статистическая обработка экспериментальных данных адекватна, их достоверность не вызывает сомнений.

Оценка содержания диссертационной работы и ее завершенности

Во «Введении» автор формулирует цели и задачи работы, обосновывается ее актуальность, теоретическая и практическая значимость.

В «Обзоре литературы» последовательно излагается всё, что необходимо для понимания цели работ, а именно: описываются основные механизмы инициации трансляции у эукариот и способы её регуляции, способы моделирования разнообразных клеточных стрессов и последние данные об изучении локализации трансляции. Эта часть работы весьма обширна, однако её чтение можно назвать легкой прогулкой по тенистым садам российской научной словесности: чему способствует доходчивый и

лаконичный стиль изложения материала и малое количество ошибок и опечаток.

Глава «Материалы и методы» содержит 16 подразделов и соответствует поставленным экспериментальным задачам. Все экспериментальные процедуры и условия описаны подробно, что позволит при необходимости их воспроизвести.

В главе «Результаты и обсуждение» описаны многочисленные задачи, решенные автором. Из них можно выделить, в частности:

1. разработку метода краткосрочной мРНК-трансфекции (FLERT), позволяющего выявлять дифференциальные изменения трансляции репортерных мРНК в культивируемых клетках;
2. обнаружение дифференциальных изменений трансляции мРНК с разными типами инициации при различных стрессах;
3. исследование трансляции безлидерной мРНК в эукариотических клетках;
4. обнаружение способности искусственной мРНК, содержащей интрон, при трансфекции в активно пролиферирующие клетки подвергаться сплайсингу и эффективно транслироваться в дальнейшем;
5. убедительное доказательство того, что амикумацин А и бластицидин S ингибируют трансляцию в эукариотической системе на стадии элонгации;
6. попытка охарактеризовать эффекты локализации мРНК на ее трансляцию.

Стоит отметить, что выполненная работа грандиозна по своим масштабам. Обращает внимание тщательность автора в постановке экспериментов и контролей к ним, а также профессиональное мастерство автора.

Выводы автора диссертации сформулированы кратко и корректно, они полностью соответствуют представленным данным.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертационной работы оформлен по стандартной схеме и соответствует установленным требованиям, материал автореферата точно и достоверно отражает результаты проведенных исследований, дает исчерпывающее представление о содержании диссертации и степени участия автора в исследованиях.

Замечания и комментарии к диссертационной работе

Чем больше по объему диссертация, тем больше шансов не только найти в ней что-либо полезное – что не может не понравиться читателю, но и обнаружить недочеты – что не может не радовать рецензента.

К разделу «Обзор литературы»:

1. Стр.17 – оптимальный контекст AUG-кодона обозначен как пурины в положении -4 и +3, тогда как, очевидно, должно быть -3 и +4.
 - а. Там же – опечатка «инициациаторный»
2. Стр. 20 – указан рис.1 вместо рис.2
3. Стр. 27 – вместо ссылки Peer et al. (обзор), стоило бы указать оригинальную работу Meyer et al., 2015.
4. Стр. 38 – «...SRP (англ. SignalRecognitionParticle – сигнал-распознающийбелок)». Particle – частица, не белок.

Там же – «...короткого пептида, кодируемого секретируемыми или белками люмена ЭПР, или трансмембранных доменов (ТМД) мембранных белков». Вызывает вопросы выражение «пептида, кодируемого белками».

5. Не всегда там, где можно, цитируются работы, вышедшие за последнее время. В частности, использованные обзоры по механизмам инициации трансляции датированы 2012 годом.

К разделу «Материалы и методы»:

1. В пункте 3.2.7. указано, что «Перед транскрипцией ПЦР-продукт тщательно очищали от белков», но как это делается непонятно: то ли обычное выделение ДНК из геля с помощью коммерческих наборов, то ли существует особый способ.

К разделу «Результаты и обсуждение»:

1. Если обзор литературы написан, в общем, легко и понятно, то в разделе «Результаты и рассуждения» присутствуют своего рода «булыжники», о которые спотыкаешься на пути к пониманию сути эксперимента или работы. В частности, описание рисунка 7Б настолько витиевато, что пришлось от него абстрагироваться и делать вывод по рисунку самостоятельно. Здесь же в подписи рисунку не указано абсолютные значения люминесценции при трансляции какой (каких) мРНК приняты за 100%. Очевидной проблемой стандартного протокола трансфекции (по рисунку 7Б), на мой взгляд, является также и то, что некэпированная мРНК Fluc транслируется также эффективно, как и кэпированная.

Кроме того, в разделе о амикумацине А присутствует несколько странный пассаж, о структуре дрожжевой рибосомы в комплексе с амикумацином А, в котором говорится о «некоторых различиях в сайте связывания, опосредованных эукариот-специфичными С-концевыми удлинениями белков uS7 и uS11», но не говорится, что это за различия и как эти данные соотносятся с результатами, представленными в диссертации.

2. Эксперименты со стрессами, которые приводят к фосфорилированию eIF2 α , было бы неплохо «приправить» Вестерн-блотами на фосформу eIF2 α . Это не так важно, в случае FLERT-экспериментов, но было бы очень интересно сопоставить степень фосфорилирования eIF2 α с динамикой трансляции репортерных мРНК при длительном

воздействии стрессов, особенно в период восстановления трансляции. Кроме того, поскольку очевидно, что стрессы, влияющие на фосфорилирование $eIF2\alpha$, обладают и иным, специфическим, действием на другие сигнальные каскады, возможно, было бы важно исследовать степень фосфорилирования основных мишеней ключевых клеточных сигнальных путей, либо использовать более широкий спектр ингибиторов клеточных сигнальных каскадов. Это могло бы дать информацию (намек) о возможных причинах различий действия арсенита натрия и перекиси водорода на трансляцию CrPV-репортерной мРНК. Например, существуют ингибиторы mTOR, отличающиеся по воздействию на эту киназу от торина-1. Рапамицин в меньшей степени влияет на ветвь mTOR-каскада, приводящую к фосфорилированию 4EBP (и возможно, чего-то еще). Было бы интересно выяснить, ингибирует ли рапамицин трансляцию CrPV-Fluc также как торин-1. Любопытно также отметить, что исследование влияния торина-1 на фосфорилирование $eEF2$, возможно, избавило бы автора от выполнения сложных работ с получением клеток с нокаутом по гену $EF2K$. Согласно рисунку 11 торин-2 не влияет на фосфорилирование $eEF2$, следовательно, если торин-1 также не влияет на фосфорилирование $eEF2$ или торин-2 ингибирует трансляцию CrPV-Fluc, то можно было довольно уверенно говорить, что фосфорилирование $eEF2$ не сказывается на инициации трансляции CrPV-Fluc. Однако результаты автора в этой части диссертации не менее убедительны.

3. Довольно часто, особенно в части диссертации, посвященной пространственной регуляции трансляции, автор, объясняя те или иные результаты, высказывает мысль, что стабильность мРНК (в том числе репортерной) может влиять на интерпретацию экспериментов. В связи

с этим есть комментарий. Поскольку при липокатионной трансфекции, как утверждает и сам автор, значительная доля трансфицируемой мРНК остается неактивной (депонированной в липосомы), то проверить предположения автора об изменении стабильности мРНК в зависимости от компартментализации или её транслируемости методом РНК-трансфекции довольно проблематично. Для решения этой задачи всё-таки придется использовать ДНК-трансфекцию либо применять другой способ РНК-трансфекции. Кроме того, хотя автор и очень убедительно доказывает, что искусственная мРНК с интроном эффективно сплайсируется и может обладать адекватным репертуаром РНК-связывающих белков (что необходимо, конечно, еще проверить), но по части «адекватного репертуара модифицированных нуклеотидов» возникают сомнения, поскольку известно, что, по крайней мере, метилирование m₆A зависит от скорости транскрипции мРНК (Slobodin et al., Cell 169, 326–337, April 6, 2017). И в этом случае ДНК-трансфекция может оказаться предпочтительнее.

4. В экспериментах по проверке локализации продуктов репортерных мРНК в митохондриях и ЭПР методом флуоресцентной микроскопии было бы неплохо использовать маркеры ЭПР и митохондрий, чтобы не использовать не очень убедительные выражения (такие как «светящиеся области образовывали характерную для ЭПР сетчатую структуру и очерчивали внешнюю мембрану ядра»).
5. Трудно полностью согласиться с утверждением на стр. 105 «Результат, свидетельствующий об отсутствии значимых различий в регуляции трансляции двух искусственных мРНК, одна из которых претерпевает сплайсинг, склоняет к идее, что, независимо от происхождения, такие искусственные мРНК одинаковым образом распознаются клеточными РНК-связывающими белками, подвергаются модификациям и т.д.». На

рисунке 31 всё-таки видно, что в случае обработки клеток ДТТ мРНК с интроном с течением времени транслируется лучше. Однако в отсутствие на графиках обозначения доверительных интервалов и об это трудно говорить.

6. Обилие данных, представленных в работе, не позволяет ни самому автору, ни, как следствие, читателю насладиться анализом проведенных экспериментов, что особенно заметно в случае исследования длительной динамики трансляции. Можно бесконечно рассматривать графики и задаваться всё новыми вопросами о поведении кривых, о времени их «загибания», о скорости трансляции, о времени появления активной люциферазы; о том, какие лучше использовать трансфектанты, как объяснить различия в их эффекте не только на время появления люциферазы, но и на скорость ее синтеза; о том, что будет если использовать мРНК не с одним, а двумя интронами и т.д. С другой стороны, масштабность работы и возникающее многообразие вопросов свидетельствует о силе метода, предлагаемого автором для изучения трансляции в эукариотических клетках.
7. К экспериментам с интрон-содержащей мРНК нет описания самой конструкции: какие там сайты сплайсинга, в частности. Можно ли их мутацией отменить сплайсинг? Как по мнению автора клетка может отличить настоящие сайты сплайсинга в репортерной мРНК (GU и AC, вероятно) от случайных динуклеотидов GU и AC в мРНК?
8. В разделе о трансляции безлидерной мРНК используется мРНК, имеющая один G перед стартовым кодоном. Не известно ли что-либо автору о влиянии первого нуклеотида в безлидерных мРНК на трансляцию и какой нуклеотид наиболее часто является первым в безлидерных мРНК, описанных в статье Gandin et al., 2016? Из текста также не ясно использовалась ли кэпированная или некэпированная

безлидерная мРНК – интересно было бы сравнить трансляцию двух этих форм при стрессе и в норме.

9. Встречаются небольшие огрехи в тексте: «инициация» - стр. 70; «трансляционных», «доза-зависимый» - стр. – 71; «пептидил-трансферазного», «использовали» – стр. 81; «отсутствии» - стр. 105, «склоняюет»; «трансфецированные» – стр. 106; «митохондрий» – стр. 110; «подтвердилась» – стр. 124), а также отсутствие легенды к рисунку 21Б.

К разделу «Выводы»:

1. На мой взгляд, можно несколько конкретизировать вывод 4 и указать, к каким именно стрессовым воздействиям более устойчива экспрессия репортёрных мРНК, локализованных на мембране эндоплазматического ретикулума. без этого вывод представляется расплывчатым.

Приведенные выше замечания довольно незначительны и никоим образом не ставят под сомнение положения, выносимые на защиту, и не умаляют значимости диссертационного исследования.

Заключение

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 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, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Лашкевич Ксения Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,

Руководитель группы регуляции биосинтеза белка

Учреждения Российской академии наук

Институт белка РАН,

Лябин Дмитрий Николаевич

ЛБин

7 декабря 2020 г.

Контактные данные:

тел.: 7(916)8292401, e-mail: lyabin@vega.protres.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:

03.01.03 – «молекулярная биология».

Адрес места работы:

142290, (Московская область) г. Пущино, ул. Институтская, д. 4,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка

Российской академии наук, группа регуляции биосинтеза белка

Тел.: +7 (495) 514-02-18; e-mail: protres@vega.protres.ru

Подпись сотрудника ИБ РАН

Д.Н. Лябина удостоверяю:



*Зав. лабораторией
ИБ РАН Тацита*