

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

Актуальность исследования

Работа Лашкевич К.А. посвящена изучению механизмов регуляции трансляции. У эукариот значительная часть регуляции экспрессии генов отнесена именно на этап трансляции, а в случае быстрых реакций – большая часть регуляции. Поэтому изучение этих процессов имеет несомненное фундаментальное значение, а также важное прикладное значение, так как изменения процессов трансляции часто являются причинами развития патологических процессов при онкогенезе, вирусных инфекциях и т.д. Особенностью работы является то, что все исследование проведено с использованием метода, который позволяет анализировать процессы трансляции в живых клетках, а не в системе *in vitro*. Таким образом, актуальность исследования не вызывает сомнения.

Структура и объем диссертации

Диссертация Лашкевич К.А. состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы, Список литературы. Объем диссертации – 138 страниц. Диссертация содержит 44 рисунка и 3 таблицы. Список литературы включает 168 источников. Обзор литературы написан достаточно необычно. Значительная его часть содержит подробнейшее описание организации трансляционного аппарата клетки (с упором на работу и регуляцию различных трансляционных факторов). Эта часть Обзора литературы стилистически скорее похожа на учебное пособие, приводимые данные не поддержаны необходимым библиографическим аппаратом (имеются немногочисленные ссылки). Вторая часть обзора, напротив, имеет стандартную организацию, приводится очень разнообразный материал, включая недавние публикации. Еще одной особенностью Обзора литературы является достаточно частые отсылки к результатам, полученным автором, т.е. анализ литературы хорошо увязан с собственной работой автора исследования. В целом, Обзор литературы хорошо интегрирован в текст диссертации, помогая пониманию текста работы. Раздел Материалы и методы написан неровно, некоторые методы описаны слишком кратко или не описаны совсем (например, в разделе про получение компетентных клеток методика получения компетентных клеток не приводится). Экспериментальный изложен последовательно,

результаты каждого раздела диссертационной работы взаимно дополняют друг друга. Имеются отдельные недостатки, которые будут описаны в соответствующем разделе отзыва.

Диссертационная работа носит полноценный и завершённый характер, как в научном плане, так и в оформлении. Автореферат позволяет составить представление как о содержании диссертации, так же и о выполнении всех формальных требований, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук.

Основные результаты работы

Работа состоит из нескольких разделов, которые по биологическим задачам слабо связаны друг с другом. Связующим элементом всей диссертации является используемый метод мРНК-трансфекции, что отражено и в названии диссертации. Как результат, работа достаточно однородна методически, но полученные научные результаты относятся к нескольким темам.

Первая часть диссертации посвящена изучению регуляции трансляции с упором на краткосрочные эффекты. Для этого предлагается оригинальная экспериментальная стратегия, которую автор диссертации последовательно использует для клеточных стрессов на трансляцию мРНК с различными механизмами инициации трансляции, для изучения трансляция безлидерной мРНК, а также для изучения механизмов действия антибиотика аникумацина А. К этой же части диссертации автор отнес описание механизмов действия бластицидина S, хотя для изучения этого антибиотика была предложена принципиально иная методика. Затем в диссертации описываются результаты изучения трансляции РНК с невырезанным интроном.

Если первая часть работы была, так или иначе, связана с изучением влияния особенностей мРНК на процессы трансляции, то вторая описывает возможную роль локализации транскриптов в особенностях протекания и регуляции трансляции в условиях стресса. Особенно важным кажутся наблюдения о том, что экспрессия репортерных РНК, локализованных на эндоплазматическом ретикулуме, может быть более устойчивой к части стрессовых воздействий, по сравнению с цитозольной РНК. Хотя в работе механизм и не выявлен, но само явление, вне всякого сомнения, заслуживает дальнейшего изучения.

Научная новизна и научно-практическая значимость работы

Новизна полученных данных определяется использованием метода, который, по-видимому, позволяет в большей степени характеризовать реальные процессы, чем широко используемые *in vitro* методы. Как экспериментальный материал, так и разработанные методические подходы имеют большое теоретическое и практическое значение.

Достоверность и обоснованность сделанных выводов

Проделан внушительный объем работы, исследование проведено на высоком методическом уровне, материал изложен и проиллюстрирован подробно. Надежность и достоверность полученных данных обеспечивается квалифицированным применением современных молекулярно- и клеточно-биологических методов исследований. Работа прошла солидную апробацию, по результатам ее выполнения опубликовано три статьи, данные представлялись на конференциях.

В работе Лашкевич К.А. не удалось обнаружить существенных недостатков. Все эксперименты сделаны на самом высоком методическом уровне, но в некоторых местах описание методов исследования и полученных результатов проведено не самым удачным образом. Ниже приводится перечень некоторых вопросов и замечаний к тексту диссертации (цитируемые фрагменты диссертации выделены курсивом).

1. Формулировки задач не соответствуют сделанным выводам. В целом, формулировки задач неудачны, они имеют скорее методологический, чем научный характер, не соответствуя уровню и научной ценности проведенного исследования.

2. Плазмиды *Luc2CP*, *Luc2CP_Intron*, *pX458* были приобретены на AddGene (#62857, #62858, #48138, соответственно).

Одним из требований Addgene является обязательность благодарности в адрес того, кто депонирует плазмиды, а также ссылки на статью, в которой была описана плазида.

3. При описании метода анализа клеточного цикла на проточном цитофлуориметре указано следующее: *“Инкубировали в холодильнике при +4°C минимум 2 часа, затем окрашивали пропидий йодидом. Для этого откручивали спиртовой раствор клеток при 1000 об/мин 6 мин. Отбирали насухо спирт, осадок ресуспендировали в PBS. Откручивали 10 минут на 6000 об/мин, отбирали супернатант и ресуспендировали осадок в 200 мкл PBS. Добавляем 1 мкл РНКазы 100 мкг/мл (сток 20 мг/мл) и инкубировали 40 минут при 37°C. Добавляли 200 мкл (50мкг/мл) пропидий йодида, инкубировали 2-3 минуты.”*

Какой смысл два раза окрашивать пропидий йодидом?

4. В некоторых местах описание недостаточно конкретизировано, автор отсылает к рисункам. Например:

стр. 90 *Разные трансфицирующие реагенты показали разную степень эффективности трансфекции одной и той же мРНК, разные времена начала выхода продукта (от 10-15 минут до 60 минут после трансфекции) и разные начальные скорости накопления продукта, что стоит учитывать, например, при планировании краткосрочных (на 1-2 часа) экспериментов (рис. 20 Б).*

Возможно, небольшой итог (оптимальный режим работы) был бы тут уместен.

5. Не понятен вывод о механизме сплайсинга трансфицированной мРНК. Автор делает предположение, что РНК сплайсируется в ядре, куда попадает в ходе митоза. Причем, в

тексте неоднократно говорится, что РНК попадает в ядро, хотя никакого экспериментального указания на это не приводится. Но теоретически возможно и другое объяснение. Факт сплайсинга может объясняться попаданием компонентов сплайсинга в цитоплазму при митозе (сейчас хорошо известно, что большинство ядерных белков в митозе оказывается в цитоплазме, а после митоза медленно реимпортируется обратно). Мне неизвестны работы о перемещениях РНК в ходе митоза, но если РНК ведут себя подобно белкам, то альтернативное предположение будет верным. Есть какие-то дополнительные соображения в пользу высказанной идеи?

6. Не понятен выбор модели непродлиферирующей культуры (гепатоциты мыши, хотя вся работа сделана на культурах человека). Почему не взята (или не получена) непродлиферирующая культура клеток человека?

7. Для обоснования локализации РНК на эндоплазматическом ретикулуме и митохондриях автор провел красивые эксперименты по локализации продуктов трансляции этих РНК (стр. 110-112). Однако сами структуры идентифицированы не были (отсутствует окрашивание маркерами данных структур).

8. Неудачен вывод 6 (*Синтезированная in vitro искусственная мРНК, содержащая интрон, при трансфекции в активно пролиферирующие клетки подвергается сплайсингу и эффективно транслируется*). В такой формулировке возникает ощущение, что сплайсинг происходит в цитоплазме, хотя данные автора говорят о более сложной ситуации. Вывод должен читаться и быть однозначно трактуемым без чтения текста.

Почти все эти вопросы имеют скорее отношение к тексту диссертации, чем к ее научному содержанию, т.е. не снижают общего положительного впечатления от диссертации Лашкевич К.А. Как и любая хорошая работа эта диссертация не только описывает ответы на поставленные вопросы, но и ставит множество новых. Из-за этого работа выглядит незавершенной, но это скорее говорит о большом потенциале ее развития.

Заключение

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. 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» (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, 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:

доктор биологических наук,

заведующий лабораторией ультраструктуры клеточного ядра

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

Федерального государственного бюджетного

образовательного учреждения высшего образования

«Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,

Шеваль Евгений Валерьевич

Σ. u

Σ

Контактная информация:

Адрес места работы: 119991 Москва, Ленинские горы, дом 1, стр 40

Телефон: 8(495)939-55-28

E-mail: sheval_e@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защита диссертация:

03.03.04 - Клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки)

Подпись д.б.н. Е.В. Шеваля

«Удостоверяю»

Ученый секретарь

НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского

МГУ имени М.В. Ломоносова,

доктор физико-математических наук



З.Г. Фетисова