

## ОТЗЫВ

официального оппонента Локтева В.Б. на диссертационную работу  
Гопаненко Александра Витальевича «Новые функции рибосомных белков  
eS1, uS19 и eL29 человека, выявленные с помощью методов, основанных на  
высокопроизводительном секвенировании РНК», представленную на  
соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности  
03.01.03 – «молекулярная биология»

Актуальность и новизна диссертационной работы связана с тем, что она направлена на исследование одного из ключевых механизмов синтеза белка в клетке и организме. Синтез белков на рибосомах лежит в основе жизни, и он является одним из важнейших молекулярных механизмов клетки. Именно рибосомы обеспечивает синтез всех белковых молекул биосферы нашей планеты. Значение рибосомы для всех живых организмов невозможно переоценить, только через знание особенностей строения и работы рибосомы можно подойти к пониманию работы белок синтезирующего аппарата клетки. Это, вне всякого сомнения, важнейшая фундаментальная проблема молекулярной и клеточной биологии. Понимание проблем биосинтеза белка на рибосомах принципиально важно для всех нас. Наверное, все согласятся с простым утверждением о том, что простое снижение уровня биосинтеза белка на планете чревато голодом и гибелью для многих видов животных. Человек также не является исключением из этого правила. Помимо этого, понимание тонких механизмов работы рибосомы и особенностей их регуляции имеет колоссальное значение для решения многих медицинских проблем, связанных с болезнями нарушения синтеза белков в организме.

Развитие технологий высокопроизводительного секвенирования РНК в сочетании с их удешевлением привело к появлению ряда мощных инструментов, которые дают возможность изучать РНК-белковые взаимодействия в живых клетках. В сочетании с другими методами методология секвенирования позволяет проводить исследование функциональной активности рибосомных белков вне белоксинтезирующего

аппарата клетки. Выявление роли отдельных структурных мотивов рибосомных белков в процессе трансляции представляется также весьма актуальным. Фундаментальное значение структурно-функциональных аспектов молекулярных процессов, протекающих в клетках с участием рибосомных белков, не вызывает сомнений.

Целью диссертационной работы было исследование функций рибосомных белков eS1, uS19 и eL29 человека с использованием новых методов высокопроизводительного секвенирования.

Диссертация Гопаненко А.В. написана по традиционному плану и состоит из трех основных разделов: обзора литературы (1), раздела с описанием материалов и методов (2) и описанием собственно результатов и их обсуждением (3). Данные разделы дополнены введением, заключением, выводами, списком использованной литературы и двумя приложениями. Во введении определены актуальность проблемы, цели и задачи работы, научная новизна, теоретическая и практическая ценность полученных результатов, а также положения, выносимые автором на защиту. Обзор написан подробно, ясно и логично. Раздел материалы и методы свидетельствует о том, что работа выполнена с использованием самых современных методов молекулярной биологии и не оставляет сомнений в достоверности полученных результатов и адекватности их анализа. Результаты собственных исследований изложены в разделе 3 разбитом на ряд подразделов. Результаты представлены четко и последовательно, хорошо иллюстрированы, что убеждает в полноте проведенного исследования и достоверности полученных результатов. Обсуждение результатов, выделенное в отдельный подраздел диссертационной работы проведено достаточно полно.

Целью настоящей работы, в формулировке автора работы, «являлось выявление функций рибосомных белков eS1 и uS19 человека, опосредованных их взаимодействиями с РНК вне трансляционной машины и в качестве её компонента, с помощью метода PAR-CLIP и роли рибосомного белка eL29 человека в регуляции экспрессии генов на уровне транскриптома с помощью метода РНК-сек.».

В процессе выполнения диссертационной работы автором были сформулированы и решались следующие основные задачи:

- Получение клеточных линий на основе клеток HEK293, продуцирующих FLAG-меченые рибосомные белки eS1 и uS19;
- Выявление РНК (помимо рРНК), взаимодействующих с eS1 вне рибосомы и исследование особенностей этих взаимодействий;

- Картирование участков клеточных мРНК, с которыми взаимодействует белок uS19 и определение структурно-функциональных особенностей этих взаимодействий;
- Конструирование клеток НЕК293 с нокдауном белка eL29 для оценки влияния дефицита eL29 на экспрессию генов на уровне транскриптома.

В рамках настоящей работы выявлены новые неканонические функции рибосомных белков eS1 и eL29 человека при сплайсинге. Найдены регионы мРНК, взаимодействующие с uS19. В частности, с помощью метода PAR-CLIP идентифицированы РНК, кодируемые генами RNU11 и RNU5A-1. Установлено, что в клетках eS1 ассоциирован с U11 пре-мяРНК в ядре и цитоплазме и со зрелой U11 мяРНК в составе U11/U12 мяРНК в ядре, а неструктурированный лизин-богатый N-концевой участок 9–29 eS1 взаимодействует с Sm-сайтом U11 пре-мяРНК и с апикальной петлей I U5 мяРНК. Продемонстрировано, что дефицит eS1 в клетках приводит к увеличению доли незрелой U11 пре-мяРНК и снижению эффективности вырезания минорных интронов из пре-мРНК, что указывает на вовлечение этого белка в биогенез U11 мяРНК и работу малой сплайсосомы. Определены регионы мРНК, с которыми взаимодействует uS19, находясь в составе транслирующих рибосом. Показано, что данные регионы мРНК представлены последовательностями с высокой встречаемостью кодонов для лизина, глутамин и аргинина. Показано, что снижение уровня рибосомного белка eL29 в клетках НЕК293 всего в 2.5 раза приводит к значительной реорганизации профиля транскриптома клеток, что выражается в изменении экспрессии более 1000 генов. Выявленные дифференциально экспрессируемые гены участвуют в различных клеточных процессах, включая регуляцию биогенеза рибосом, регуляцию трансляции и апоптоз. Высказано предположение, что дисбаланс eL29 ассоциирован с процессом злокачественной трансформации клеток.

К важнейшим достижениям диссертационной работы следует отнести:

- Получение стабильных линии клеток НЕК293, индуцибельно продуцирующие FLAG-меченые рибосомные белки eS1 и uS19 человека.
- Выявление взаимодействия рибосомного белка eS1 с клеточными РНК, кодируемые генами RNU11 и RNU5A-1.
- Установление факта, что дефицит eS1 приводит к нарушению процессинга U11 пре-мяРНК, что проявляется в повышении её

уровня относительно уровня зрелой U11 мРНК и в снижении эффективности сплайсинга пре-мРНК с редкими интронами.

- Обнаружение, что в претранслокационных комплексах 80S рибосом белок uS19, контактирующий с мРНК в А-участке при отсутствии в нем лиганда, взаимодействует с регионами мРНК, кодирующими аминокислотные остатки Lys/Glu и Arg.
- Дефицит рибосомного белка eL29 в клетках приводит к существенной реорганизации транскриптома клетки, что отражается в изменении экспрессии множества генов, среди которых присутствуют гены-мишени транскрипционных факторов p53 и c-Myc.

Рассмотрение работы показывает, что диссертационная работа Гопаненко Александра Витальевича является самостоятельным законченным исследованием, посвященным структурно-функциональной характеристике рибосомных белков eS1, uS19 и eL29 человека с привлечением методов, основанных на высокопроизводительном секвенировании.

Представленная работа не лишена определенных недостатков. К ним следует отнести:

- В раздел материалы и методы было бы целесообразно внести описание исходной клеточной линии, ссылку на паспортные данные клеточной линии НЕК293.
- Автором получен ряд новых клеточных линий на основе клеток НЕК293, формализовать их описание, например в приложении к работе, может оказаться полезным для исследователей, работающих в этой и смежных областях.
- Количество неточностей и опечаток в работе минимальное. Некоторые редакционные замечания связаны с возможным улучшением диссертационной работы. Например, было бы целесообразно озаглавить приложение 1 и 2. Сокращение объема работы также упростило работу с диссертацией. В целом, должен признать, что в этом отношении работу можно признать образцовой.

Эти недостатки не снижают научной значимости диссертационной работы и, оценивая работу в целом, можно сказать, что проведенные исследования принесли интересные научные результаты, их новизна и достоверность не вызывают сомнений.

На мой взгляд, для достижения основных результатов диссертационной работы был использован адекватный набор молекулярно-биологических

методов исследования в сочетании с современными методами высокопроизводительного секвенирования и анализа полученных массивов последовательностей методами компьютерного анализа.

Это позволило автору успешно решить задачи диссертационной работы. Диссертация представляет законченное исследование, выполненное на современном методическом и теоретическом уровнях. Выводы сформулированы корректно и соответствуют полученным результатам. Основные положения автореферата полноценно отражают материалы диссертационной работы.

Диссертационная работа выполнена в классическом стиле, она изложена на 178 страницах, содержит 44 рисунка, 4 таблицы и два приложения. Список литературы содержит 341 ссылку на работы отечественных и зарубежных авторов.

Полученные результаты были апробированы на ряде российских и международных конференций и конгрессах. По теме диссертации опубликовано 3 научные статьи в международных высокорейтинговых журналах индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

### **Заключение**

Оценивая работу в целом, можно твердо сказать, что проведенные исследования принесли интересные научные результаты, их новизна и достоверность не вызывают сомнений. Описано получение клеточных линий на основе клеток НЕК293, продуцирующих FLAG-меченые рибосомные белки eS1 и uS19. Обнаружены РНК (помимо рРНК), взаимодействующих с eS1 вне рибосомы и выполнено исследование особенностей взаимодействий белка и нуклеиновой кислоты. Картирование участков клеточных мРНК, с которыми взаимодействует белок uS19 позволило определить структурно-функциональные особенности этих взаимодействий. Получение клеток НЕК293 с нокдауном белка eL29 позволило оценить влияние дефицита eL29 на экспрессию клеточных генов на уровне транскриптома.

Представляется, что диссертационная работа закладывает фундаментальные основы для развития дальнейших исследований в области исследования структуры и функции рибосомальных белков, что может существенно расширить наши знания и представления в этой области науки.

Обобщая вышесказанное, можно сказать, что, несмотря на некоторые замечания, которые носят дискуссионный и редакционный характер, большая научная и практическая важность работы Гопаненко А.В. «Новые функции рибосомных белков eS1, uS19 И eL29 человека, выявленные с

помощью методов, основанных на высокопроизводительном секвенировании РНК», дает все основания считать, что диссертационная работа соответствует паспорту специальности 03.01.03 – молекулярной биология и полностью соответствует требованиям критериям пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к кандидатским диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Диссертационная работа оформлена в соответствии с Приложениями № 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН. Автор диссертации, Гопаненко Александр Витальевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Зав. отделом  
молекулярной вирусологии  
флавивирусов и вирусных гепатитов,  
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
Роспотребнадзора,  
д.б.н., проф.

  
В.Б. Локтев

Подпись Локтева В.Б. заверяю:  
И.о. зам. генерального директора  
по научно-методической работе и  
международному сотрудничеству  
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

  
  
Т.С. Непомнящих

Локтев Валерий Борисович  
630559, Новосибирская обл., п. Кольцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»  
Роспотребнадзора  
Тел (383) 3367400 доп.2453  
[loktev@vector.nsc.ru](mailto:loktev@vector.nsc.ru)

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии  
«Вектор» Роспотребнадзора.  
Д.б.н., профессор, заведующий отделом молекулярной вирусологии  
флавивирусов и вирусных гепатитов.