

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Гопаненко Александра Витальевича “НОВЫЕ ФУНКЦИИ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ eS1, uS19 И eL29 ЧЕЛОВЕКА, ВЫЯВЛЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ, ОСНОВАННЫХ НА ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОМ СЕКВЕНИРОВАНИИ РНК”, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ: Диссертационная работа Александра Витальевича Гопаненко посвящена изучению функций, в том числе неканонических функций, нескольких рибосомных белков человека. Рибосомные белки являются важными структурными компонентами рибосомы, молекулярной машины, отвечающей за биосинтез белков в клетках. Хотя основная роль рибосомных белков, безусловно, участие в биосинтезе белка в составе рибосомы, для многих подобных белков имеются и более специализированные задачи. Это могут быть внерибосомные функции, когда рибосомные белки взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами вне контекста рибосомы. Наиболее известная из них это регуляция сплайсинга собственных пре-мРНК. Рибосомные белки могут иметь и специальные роли в составе рибосомы, например, способствовать селективной трансляции конкретных мРНК.

Диссертационная работа посвящена изучению функций трех рибосомных белков, eS1, uS19 и eL29. Эти белки были выбраны не случайно. Так, белок eS1, как компонент рибосомы, образует специфичный контакт с IRES элементом вируса гепатита С, а вне рибосомы был замечен во взаимодействии с белком-сенсором повреждений ДНК PARP1, а также транскрипционным фактором CHOP. Белок uS19 имеет эукариот-специфичный довесок на С-конце, участвующий в образовании декодирующего центра рибосомы. Этот участок белка образует прямые сшивки с кодоном мРНК, находящимся в А-участке рибосомы. Таким образом, данный контакт может служить своеобразным сенсором А-участка рибосомы. С помощью сшивания с этим белком можно оценивать частоту нахождения в рибосоме различных участков клеточных мРНК. Белок eL29 является не только компонентом рибосомы, но и присутствует на поверхности клеток, взаимодействуя с элементами внеклеточного матрикса. Это само по себе говорит о существовании необычных функций данного белка.

В представленной работе, для изучения выбранных рибосомных белков используются новейшие методы работы, основанные на высокопроизводительном секвенировании, такие, как PAR-CLIP, RNA-seq и разработанный в рамках данной работы гибридный метод, сочетающий в себе элементы PAR-CLIP и Ribo-seq. Использование этих методов, в сочетании с хорошей генно-инженерной работой и, конечно, классическими методами работы с эукариотическими рибосомами, позволило поднять актуальность работы на новую высоту.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА: В работе применен широчайший набор классических биохимических методов изучения РНК-белковых взаимодействий, высокого уровня генная инженерия и использованы современные методы высокопроизводительного секвенирования. В том числе, разработана интересная комбинация методов фотоаффинного сшивания – секвенирования (PAR-CLIP) и рибосомного профилирования (Ribo-Seq). Применение новой методологии позволило получить новые научные данные о функциональной роли рибосомных белков.

Все результаты, полученные в работе, являются новыми, впервые полученными и опубликованными автором в научных журналах высокого международного уровня. Среди наиболее значимых результатов работы, имеющих наиболее высокую научную новизну и значимость для развития фундаментальной науки можно перечислить следующие:

Во-первых, автором была обнаружена совершенно неожиданная и интереснейшая внерибосомная функция рибосомного белка eS1. Оказалось, что он взаимодействует с компонентами минорной сплайсеосомы, участвует в созревании и дальнейшем функционировании U11 мРНК. Это совершеннейшая неожиданность для научного сообщества.

Во-вторых, найдено неожиданное свойство рибосомного белка uS19 образовывать сшивки с последовательностями мРНК, содержащими полипуриновые участки, кодирующие лизин, глютаминовую кислоту и аргинин.

В-третьих, обнаружено влияние рибосомного белка eL29 на эффективность экспрессии большого числа генов человека, объединенных в несколько важнейших сигнальных путей. Таким образом, в работе, безусловно, присутствует новизна исследования. Все результаты исследования оригинальны и интересны для научного сообщества.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ: Диссертационная работа Александра Витальевича Гопаненко представляет и практический интерес. Понимание механизмов регуляции

экспрессии генов человека важно для разработки методов лечения заболеваний. Так, мутации в генах рибосомных белков приводят к нескольким наследственным болезням, а изменение уровней экспрессии генов рибосомных белков возникает при старении. Также имеет высокую значимость понимание функционирования аппарата биосинтеза белка в раковых клетках, в которых биосинтез белка имеет решающее значение для поддержания пролиферативного потенциала. Наконец, участие конкретных рибосомных белков, исследованных в диссертационной работе, таких, как eL19, в регуляции экспрессии генов каскадов p53 и c-Myc имеет самое непосредственное отношение к развитию злокачественных опухолей.

Конечно, перспективы практического применения результатов диссертационной работы в медицине это дело достаточно далекого будущего. Однако уже сейчас результаты работы будут востребованы международным научным сообществом как неотъемлемая часть научно-технического прогресса в области молекулярной биологии.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ: Диссертация Александра Витальевича Гопаненко написана по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Диссертация изложена на 178 страницах машинописи и содержит 44 рисунка, 4 таблицы и 2 приложения. Список цитируемой литературы насчитывает 341 источник отечественных и зарубежных авторов.

Обзор литературы посвящен всеобъемлющему анализу имеющихся сведений о рибосомных белках человека и их функциях. При этом обсуждается подробно как функционирование рибосомных белков в контексте структуры рибосомы, так и их внерибосомные функции. Подробно освещено участие рибосомных белков в репликации и репарации ДНК, транскрипции, созревании РНК и в трансляции. Описана вовлеченность рибосомных белков в работу ряда сигнальных каскадов клеток. Обзор научной литературы отлично подготавливает читателя к пониманию вопросов, решаемых в части «Результаты и их обсуждение». Обзор литературы информативен, легко читается. Обращает на себя внимание подробность, последовательность и ясность в изложении материала, видна работа со всеми источниками информации, имеющими отношение к выбранной теме работы. Чувствуется большая эрудиция автора, прекрасное владение материалом и тщательность в анализе данных научной литературы. Число цитируемых в

диссертации источников, 341, бьет рекорды. Это число вполне могло бы характеризовать библиографию докторской диссертации.

Раздел Материалы и методы написан чрезвычайно подробно и позволяет понять все, что было сделано автором, и при необходимости воспроизвести эксперименты. Более того, эта глава диссертации может служить прекрасным справочником или методическим пособием для студентов и аспирантов, работающих как в области биосинтеза белка, так и использующих в своей работе методы, основанные на высокопроизводительном секвенировании.

В главе “Новые функции рибосомных белков eS1, uS19 и eL29 человека, выявленные с помощью методов, основанных на высокопроизводительном секвенировании РНК (Результаты и их обсуждение)” автор приводит описание полученных экспериментальных данных. Глава разбита на несколько глав, каждая из которых посвящена одному из аспектов работы. Все главы логично связаны общей темой, функционированием рибосомных белков человека, и общей методологией, применением методов высокопроизводительного секвенирования.

Работа начинается с создания модельных клеточных линий в которых экспрессируется ген гибрида белка eS1 с довеском для аффинного выделения. Создав необходимую линию клеток, автор переходит к опытам по фотоаффинному сшиванию белка eS1 с РНК после включения в последние фотоактивируемых аналогов нуклеозидов. В результате этих опытов неожиданно оказывается, что белок eS1 взаимодействует с U5 и U11 мРНК. U11 мРНК является компонентом необычной рибонуклеопротеидной машины, т.н. минорной сплайсеосомы, в то время, как U5 мРНК входит в состав и мажорной и минорной сплайсеосом. После получения этого волнующего результата автор проводит весьма обстоятельное исследование того, как eS1 участвует в созревании и функционировании компонентов минорной сплайсеосомы, используя как *in vivo*, так и *in vitro* методы работы. В результате открывается совершенно неожиданная история о вне ribosomal функции рибосомного белка eS1.

Вторая часть работы посвящена изучению контактов белка uS19 с мРНК. Следует отметить, что сшивку С-концевого участка данного белка с участком мРНК, находящимся в А-сайте малой субчастицы, наблюдали в лаборатории Галины Георгиевны Карповой, научного руководителя Александра Витальевича, уже давно. Однако это было осуществлено в экспериментах *in vitro*, на модельной системе. В данной диссертационной работе способность uS19 сшиваться с мРНК использовали для картирования контактов А-

сайта рибосомы со всей совокупностью транслируемых в клетке мРНК. Для этого был разработан интересный «гибридный» метод, сочетающий методические элементы рибосомного профилирования, Ribo-seq и фотоаффинного сшивания, PAR-CLIP.

Результат этой части работы также необычен. Были выявлены участки мРНК, наиболее эффективно сшивающиеся с uS19 в составе рибосом. Ими оказались участки с весьма необычным нуклеотидным составом, обогащенные пуриновыми нуклеотидами и кодирующие повторяющиеся остатки лизина, глутаминовой кислоты и аргинина.

Наконец, в завершающей части работы автор исследует влияние рибосомного белка с известной и необычной вне ribосомной функцией, eL29, на экспрессию генов человека. Для этого автором был проведен нокдаун мРНК, кодирующей данный белок, и исследован транскриптом полученных клеток. Среди дифференциально экспрессирующихся генов было выявлено большое количество генов, относящихся к нескольким важным процессам по классификации GeneOntology, таким, как контроль качества неправильно свернутых белков, ответ на стресс эндоплазматического ретикулума, организация митохондрий, регуляция активностей ГТФаз и регуляция активности митотического цикла (гены с повышенной экспрессией) и, среди прочих категорий, процессинг РНК, биогенез рибонуклеопротеиновых комплексов и функционирование белок-синтезирующего аппарата (гены с пониженной экспрессией). Интересным было и обнаружение среди дифференциально экспрессирующихся генов регулонов, относящихся к сигнальным путям p53 и c-Myc. Эти сигнальные пути имеют значение для канцерогенеза, что еще раз подтверждает высокую практическую и медицинскую значимость данной работы.

Работа Александра Витальевича Гопаненко “НОВЫЕ ФУНКЦИИ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ eS1, uS19 И eL29 ЧЕЛОВЕКА, ВЫЯВЛЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ, ОСНОВАННЫХ НА ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОМ СЕКВЕНИРОВАНИИ РНК” выполнена на высочайшем научном уровне. Об этом свидетельствует не только текст и иллюстрации самой диссертации, но и отличный список публикаций автора в престижных международных журналах. По результатам работы опубликовано 3 статьи в международных журналах, включая 2 статьи в журнале Nucleic Acids Research, импакт фактор которого поднялся до уровня 11.5! Это замечательный результат, свидетельствующий о международном признании автора мировым научным сообществом.

Как и во всякой интересной работе, в работе можно обнаружить некоторые недостатки.

Стр. 21. Для обозначения теломеразной РНК использование сокращение hRT. Это ошибка, необходимо использовать сокращение hTR.

Стр. 21 «плеяда ... данных». Термин «плеяда» используется по отношению к людям, выдающимся представителям кокой-либо области деятельности, но не к данным.

Там же, «... процесс связан с процессом» звучит некрасиво

Рис. 3 перепутаны полимеразы II и III

Стр. 41-42 по отношению к слову регуляция разумно использовать эпитет «сложная», вместо «тонкая» (ведь нет «толстой» регуляции). Тем более не стоит писать, что регуляция «четкая» (ведь она вряд ли может быть «расплывчатой»).

Стр. 51 опечатка в названии раздела «собтвенных»

Стр.62 «Данные о роли рибосомных белков и их пост-трансляционных модификаций в специализированной трансляции, накопленные за два последних десятилетия, свидетельствуют о том, что рибосома осуществляет трансляционный контроль экспрессии генов.» Хм, то, что рибосома осуществляет «трансляционный контроль экспрессии генов» самоочевидно.

Стр. 88 mosquitoes переводится как комары

Рис. 18Б Странен тот факт, что во фракциях градиента данные иммуноблоттинга не соответствуют данным оптической плотности. Такое ощущение, что в составе моносом и полисом отношения количества рибосомных белков к РНК отличается. Почему это может быть так?

Стр. 92 «Поскольку контакты между eS1 и 18S рРНК известны благодаря вышеупомянутым крио-ЭМ моделям рибосом, риды, относящиеся к рРНК, исключены из последующего анализа.». Очень жаль, поскольку такой анализ был бы прекрасным внутренним контролем метода. Если бы пришивки eS1 к 18S рРНК, картированные с помощью используемого метода, совпали бы с ожидаемыми на основе данных крио-ЭМ, это бы прекрасно валидировало бы всю процедуру.

Рис. 20А Показан участок генома, соответствующий зрелой U11 мяРНК. Поскольку далее говорится, что eS1 взаимодействует также и с предшественником U11 мяРНК, было бы интересно посмотреть на более широкий участок картирования с помощью геномного браузера, так, чтобы увидеть всю область пре-U11 мяРНК.

Стр. 97 «...связывания U11 мяРНК с 40S субчастицами не наблюдали.» Было бы лучше использовать не 40S субчастицы в качестве контроля к U11 мяРНК, а что-либо более похожее на U11, например, U1 мяРНК.

Глава 3.1.1.7 Определение участка eS1, контактирующего с U11 мяРНК.

Поскольку было показано, что eS1 взаимодействует с пре-U11 мяРНК и это важно для эффективного созревания последней, было бы интересно расширить исследование *in vitro*, включив в него пре-U11 мяРНК.

Рис. 31 Убедительно, что наблюдающиеся зоны сшивок зависят от тиюридина и облучения. Однако, множественность наблюдаемых зон заставляет думать также и о желательности контроля на иммунопреципитацию, скажем, то же самое, но с неспецифическими антителами вместо анти-uS19.

Рис. 35 Является ли пришивка единственным возможным объяснением наблюдаемых Т/С транзиций? Интересно было бы посмотреть на те же участки просто при транскриптомном анализе, или без облучения или без тиюридина.

Стр. 138 «...Lys/Glu- и Arg-богатые полипептидные последовательности, которые могут замедлять продвижение растущей полипептидной цепи через рибосомный туннель». Это было бы интересно подкрепить данными рибосомного профилирования, например, просто взятыми из литературы.

Очевидно, что мелкие замечания, сформулированные выше, не имеют принципиального характера и не отражаются на общем прекрасном впечатлении от работы. Выводы работы абсолютно обоснованы и мелкие недостатки никак не отражаются на значимости и ценности представленной работы. Хотелось бы еще раз отметить, что обнаружение и всестороннее исследование в работе совершенно неожиданного взаимодействия eS1 с U11 мяРНК является изюминкой диссертации и вызывает огромный интерес!

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Все вышеизложенное позволяет констатировать, что диссертация Гопаненко Александра Витальевича “НОВЫЕ ФУНКЦИИ РИБОСОМНЫХ БЕЛКОВ eS1, uS19 И eL29 ЧЕЛОВЕКА, ВЫЯВЛЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ, ОСНОВАННЫХ НА ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОМ СЕКВЕНИРОВАНИИ РНК”, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, является законченным самостоятельным научным исследованием, в котором автором решен целый ряд важнейших научных задач, в рамках динамично развивающегося интересного научного направления исследований рибосомных белков. По актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация соответствует критериям пп. 2.1.-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте

химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата биологических наук, и соответствует специальности 03.01.03 – молекулярная биология. Диссертация оформлена в соответствии с Приложениями № 5 и 6 Положения о диссертационных советах Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, предъявляемым. Автор диссертации, Александр Витальевич Гопаненко без сомнения, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Сергиев Петр Владимирович

д.х.н., профессор кафедры ХПС

химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Адрес: Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40.

Телефон: +7(495)9395418

e-mail: petya@belozersky.msu.ru

Ученая степень: доктор химических наук

По специальности: 02.00.10 – биоорганическая химия



декан химического факультета

МГУ имени М.В. Ломоносова

Чл.-корр. РАН, профессор, д.х.н. Калмыков С.Н.