



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (кашт.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

на № 22.10.2018 от 401/1-217.1-686

УТВЕРЖДАЮ
директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Институт
биоорганической химии имени
академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН
академик Габитов А.Г.

« 28 » октября 2018 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук – на диссертационную работу Малыгина Алексея Аркадьевича «Структурно-функциональные особенности взаимодействий рибосомных белков человека с различными видами РНК», представленную к защите в диссертационный Совет по защите докторских и кандидатских диссертаций (Д 003.045.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) на соискание учёной степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Актуальность темы и научная новизна диссертационной работы

Диссертационная работа Малыгина А.А. посвящена изучению структурных особенностей взаимодействий рибосомных белков человека с разными видами РНК, лежащих в основе различных клеточных процессов, не связанных непосредственно с трансляцией клеточных мРНК.

Рибосомные белки представляют собой большую группу белков – конструктивных компонентов рибосомы, участвующих в формировании и поддержании её структуры и обеспечивающих её активность в процессе трансляции. Эти белки являются необходимыми для клеток организмов всех доменов жизни, и процесс сборки рибосомных субчастиц из

pРНК и рибосомных белков является важнейшим процессом для любой клетки. Для бактериальных рибосом этот процесс хорошо изучен и показана возможность сборки её субчастиц *in vitro*. Однако попытки собрать *in vitro* активные 40S и 60S субчастицы эукариотических рибосом не увенчались успехом, что, вероятно, обусловлено как индивидуальными особенностями рибосомных белков высших эукариот, так и сложностью самих объектов сборки. В этой связи изучение особенностей РНК-белковых взаимодействий, происходящих при сборке отдельных морфологических районов рибосомных субчастиц млекопитающих, является крайне актуальным для понимания структурных аспектов механизмов фундаментальных клеточных процессов. Другим важным проявлением функциональной активности многих рибосомных белков является их вовлечение в разнообразные клеточные процессы, не сопряжённые с трансляцией мРНК на рибосомах, в том числе в процессы, связанные с регуляцией экспрессии различных генов, в том числе – собственных. В этом плане рибосомные белки прокариот также изучены существенно лучше, чем рибосомные белки эукариот, в частности млекопитающих, хотя у эукариот процесс экспрессии генов более сложен и включает стадию сплайсинга первичного транскрипта. Наконец, известно, что рибосомные белки в составе 40S субчастиц рибосом высших эукариот принимают участие в инициации трансляции геномных РНК (гРНК) многих вирусов, например вируса гепатита С (ВГС), по механизму, принципиально отличающемуся от механизма инициации трансляции экзистированных клеточных мРНК благодаря наличию в 5'-нетранслируемых областях этих РНК особых структурных элементов, так называемых IRES. Однако структурные основы молекулярного механизма IRES-зависимой инициации трансляции, обеспечивающего синтез вирусного полипротеина в обход регуляторных механизмов клетки, изучены слабо. Поэтому определение роли рибосомных белков человека в регуляции экспрессии собственных генов и инициации трансляции гРНК ВГС также является чрезвычайно актуальным. Диссертационная работа Малыгина А.А., посвящённая детальному изучению вышеизложенных аспектов, представляет собой первое выполненное на высоком научном уровне комплексное исследование структурно-функциональных свойств рибосомных белков человека, проявляемых ими в различных клеточных процессах.

Общая характеристика работы

Диссертация построена по традиционному типу и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (глава 2), результатов и обсуждения (глава 3), заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 283 страницах, содержит 86 рисунков и 6 таблиц, а библиография содержит 369 литературных источников.

Литературный обзор посвящён описанию структурно-функциональных свойств рибосомных белков млекопитающих. В нём подробно изложены современные взгляды и

концепции, касающиеся биогенеза рибосомных белков и его регуляции. Основное внимание диссертантом уделено структурным свойствам рибосомных белков, экспрессии их генов, участию рибосомных белков в сборке рибосомных субчастиц и вовлечению в биологическую активность некоторых вирусов. Отдельно рассмотрены вопросы, связанные с поддержанием клеточного баланса рибосомных белков и последствиями его нарушения, а также вопросы, касающиеся заболеваний и генетических расстройств, вызванных дисфункцией генов рибосомных белков. В качестве замечания хотелось бы отметить, что обзор смотрелся бы в более выигрышном свете, если бы в нём параллельно с рибосомными белками млекопитающих были рассмотрены соответствующие данные по рибосомным белкам дрожжей, у которых сборка рибосомных субчастиц к настоящему времени гораздо лучше изучена, чем у млекопитающих. В целом, обзор свидетельствует о широком научном кругозоре автора и его способности ориентироваться в огромном объёме литературных источников, касающихся области исследований, и позволяет оценить значимость собственных результатов соискателя.

В главе 2 представлено детальное описание экспериментальных методологических подходов, использовавшихся для решения поставленных задач. Этот раздел изложен достаточно структурированно и подробно и не оставляет сомнений в уверенном владении автором широким набором классических и современных методов, применяемых в изучении РНК-белковых взаимодействий.

Глава 3 содержит непосредственно результаты исследований, полученные диссертантом. Первая часть этой главы посвящена описанию создания платформы для получения функционально активных рекомбинантных рибосомных белков человека, что естественно, поскольку без разработки стратегии получения таких белков задачи, поставленные в диссертации, вряд ли были бы выполнимы. Хотя способ получения рекомбинантных белков, основанный на их наработке в системе *E.coli* и очистке за гексагистидиновый тэг, в настоящее время широко распространён, на момент начала описываемых исследований в отношении рибосомных белков эукариот он был далеко не очевиден. Применяв отдельные методические находки, которые были разработаны для преодоления возникших затруднений, автору удалось адаптировать этот способ для решения своих задач и показать, что получаемые рекомбинантные рибосомные белки человека, в целом, имеют структуру, аналогичную структуре природных белков, и пригодны для функциональных исследований.

Вторая часть главы 3 включает описание исследований взаимодействий рибосомных белков человека с 18S рРНК и её фрагментами. Используя рекомбинантные рибосомные белки и РНК-транскрипты, соответствующие доменам 18S рРНК, автор изучил характеристики связывания ряда рибосомных белков человека с этими РНК-транскриптами и

выявил изменения в структуре РНК, сопровождающие это связывание. Полученные результаты позволили ему сформулировать ряд важных заключений о характере взаимодействий рибосомных белков млекопитающих с рРНК при формировании рибосомных субчастиц, в частности об участии эукариот/архей специфичных фрагментов рибосомных белков человека в этом процессе. Отдельного упоминания заслуживает часть этого раздела, касающаяся изучения роли посттрансляционной модификации в рибосомном белке uL2 – гидроксирования по остатку His216 – в формировании структуры каталитического центра рибосомы человека. В ней наглядно продемонстрирован тот мощный методологический инструментарий, использованный в данной работе, который дал возможность автору фиксировать структурные переходы в РНК, вызванные связыванием с ней даже незначительно отличающихся друг от друга белков, и прийти к пониманию функционального значения этих переходов.

Результаты третьей части главы 3, в которой была выявлена конкретная роль белков 40S субчастицы рибосомы в связывании IRES ВГС, наиболее значимы с практической точки зрения. Автор установил белки, которым принадлежит определяющая роль в связывании IRES ВГС с 40S субчастицей рибосомы на начальной стадии инициации трансляции, и выявил ключевые особенности формирования бинарного комплекса 40S субчастицы с IRES, происходящего с вовлечением в этот процесс 18S рРНК. Всё это позволило предложить механизм селекции инициаторной тРНК IRES-связанными 40S субчастицами в отсутствие факторов инициации трансляции. Следует отметить, что полученная информация о природе взаимодействия IRES ВГС с 40S субчастицами рибосом человека крайне важна для понимания патогенности этого вируса и поиска лекарственных препаратов для борьбы с вызываемым им заболеванием.

Наконец, четвёртая часть главы 3 посвящена изучению авторегуляции экспрессии генов рибосомных белков человека на стадии сплайсинга. Эта область остаётся довольно слабо изученной даже в настоящее время. В связи с этим, полученное автором на примере одного из рибосомных белков доказательство *in vivo*, что продукты генов рибосомных белков могут вовлекаться в регуляцию их экспрессии на уровне сплайсинга по механизму, в основе которого лежит принцип обратной связи, является настоящим научным прорывом. В качестве замечания к этому разделу следует отметить, что автор не приводит никаких сравнительных характеристик связывания одних и тех же рибосомных белков с фрагментами пре-мРНК и фрагментами 18S рРНК (вторая часть главы 3) и не обсуждает возможных отличий в их взаимодействии с этими видами РНК. Такое обсуждение, безусловно, придало бы большее внутреннее единство излагаемому материалу.

В целом, диссертационная работа Малыгина А.А. характеризуется логичным изложением материала, аккуратно оформлена и хорошо иллюстрирована. Выводы

диссертационной работы корректны, полностью обоснованы и соответствуют полученным экспериментальным данным. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Основные результаты работы опубликованы в 26 отечественных и международных научных журналах, в том числе – высокорейтинговых, и представлены на многих научных форумах. Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации.

Значимость работы

Диссертационная работа Малыгина А.А. представляет собой первое систематическое исследование структурно-функциональных свойств индивидуальных рибосомных белков человека. Полученные в работе результаты позволили не только выявить характерные свойства рибосомных белков человека, но и определить ранее не известные черты их взаимодействий с различными видами РНК. Полученные данные существенно расширили имевшиеся на момент начала данной работы знания о функциональном предназначении рибосомных белков и дали возможность установить особенности некоторых клеточных процессов, таких как сборка рибосомных субчастиц, инициация трансляции гРНК ВГС и регуляция экспрессии генов рибосомных белков, в которых эти белки играют определяющую роль. Совокупность полученных в диссертационной работе результатов даёт новое представление о функциональных свойствах рибосомных белков человека, которое в дальнейшем позволит приступить к разработке подходов, направленных на борьбу с заболеваниями, в основе которых лежат дефекты экспрессии генов рибосомных белков, сборки рибосомных субчастиц или трансляция чужеродных для клетки мРНК.

Результаты работы могут представлять интерес для Института биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Института белка РАН, Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского при МГУ им. М.В. Ломоносова, Института цитологии РАН, Института молекулярной генетики РАН, Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирского государственного университета и других организаций, занимающихся исследованиями в области регуляции экспрессии генов.

Заключение

С учётом объёма, уровня и качества выполненных исследований, актуальности, новизны и высокой научной и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Малыгина А.А. является завершённым научно-квалификационным исследованием. Совокупность теоретических положений этого исследования можно квалифицировать как новое крупное научное достижение в решении важнейшей проблемы,

связанной с выявлением функциональных свойств рибосомных белков человека, реализуемых ими при взаимодействиях с различными видами РНК, в том числе патогенных вирусов. Таким образом, диссертация Малыгина А.А. полностью отвечает требованиям ВАК РФ к диссертациям на соискание учёной степени доктора наук, изложенным в п. 9-14 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ «О порядке присуждения учёных степеней» от 24.09.2013 №842 с изменениями от 21.04.2016 №335. Автор диссертации, Малыгин Алексей Аркадьевич, безусловно, заслуживает присуждения ему учёной степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Отзыв на диссертационную работу Малыгина А.А. подготовлен, обсуждён и утверждён на заседании отдела пептидно-белковых технологий, протокол №18, 27.10.2018, текст отзыва принят единогласно.

Отзыв составил:

Зав. лабораторией химии протеолитических ферментов
д.х.н.

И.В.Смирнов

Подпись Смирнова И.В. *заверяю*
Ученый секретарь ИБХ РАН д.ф.-м.наук

В.А.Олейников

117997, г. Москва, ул. Миклуко-Маклая, д. 16/10

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФГБУН ИБХ РАН)

тел. +79267397865

e.mail: ivansmr@inbox.ru