

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу **Малыгина Алексея Аркадьевича** «Структурно-функциональные особенности взаимодействий рибосомных белков человека с различными видами РНК», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

В «классической» физико-химической биологии исследования механизмов биосинтеза белка занимают едва ли не первое место. Десятки тысяч статей опубликованы по этой тематике, детально сформулированы механизмы процессов, протекающих с участием рибосом, расшифрованы сотни пространственных структур нуклеопротеидов и белков. Однако сказать, что все основные моменты уже выяснены и можно «почивать на лаврах», никак нельзя. Чем дальше мы продвигаемся в процессе познания фундаментальных основ трансляции, тем больше возникает новых интереснейших проблем. Диссертационная работа А.А. Малыгина прекрасно иллюстрирует это положение.

Поскольку механизмы биосинтеза белка в целом едины у всех организмов, то и у всех рибосом имеются единые, общие особенности в их строении и функционировании. Однако существуют и принципиальные различия между рибосомами, прокариот и эукариот. Эта разница имеет значение в практической области – рибосомы являются мишенями действия многих антибиотиков, и дискриминация между типами рибосом лежит в основе специфичности последних. В связи с этим сравнение структур и свойств прокариотических и эукариотических рибосом, в первую очередь патогенных бактерий и человека является приоритетной задачей.

В отличие от прокариотических рибосом, сборка которых из отдельных рибосомных белков и 16S рРНК без участия дополнительных факторов была продемонстрирована еще в 60-е годы, эукариотические рибосомы пока не удалось реконструировать *in vitro*, что, вероятно, обусловлено сложностью самого процесса сборки, требующего участия большого числа вспомогательных факторов.

Все вышесказанное приводит к выводу, что детальное исследование процессов сборки эукариотических рибосом, взаимодействия компонентов таких рибосом друг с другом и внешними факторами представляет собой важную и актуальную задачу. Такое исследование в течение многих лет проводилось А.А. Малыгиным и ныне предлагается научной общественности в качестве докторской диссертации.

Работа А. А. Малыгина содержит 283 страницы, 86 рисунков и 6 таблиц. Диссертация выполнена в классическом стиле и содержит разделы «Введение», «Обзор

литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Обзор литературы (глава 1), озаглавленный «Структурно-функциональные свойства рибосомных белков млекопитающих» имеет объем около шестидесяти страниц и содержит шесть основных разделов. В первой главе автор дает характеристику структурной организации этих белков и описание их жизненного цикла и роли в контроле биогенеза рибосом. Далее следует информация об участии рибосомных белков в процессе трансляции и биогенезе некоторых вирусов, и заканчивается глава обзором экстрарибосомальных функций рибосомных белков. Общее количество ссылок составляет 369 источников, значительное количество из которых представляют собой работы последних лет, что наглядно свидетельствует об актуальности предмета исследования. Такое построение литературного обзора мне представляется весьма удачным – автор в сжатой, но чрезвычайно убедительной форме описал основной круг тех разделов современной «рибосомологии», в которые вносит вклад его работа. Для читателя, не являющегося узким специалистом в данной области (к каковым принадлежу и я) полностью раскрыта базовая информация, на которой основана диссертационная работа.

Раздел «Материалы и Методы» (глава 2) подробно и обстоятельно описывает все экспериментальные процедуры, задействованные в процессе выполнения диссертационной работы. Методики представлены весьма подробно, что не оставляет сомнений в возможности их воспроизведения; они в значительной степени могут быть использованы молодыми исследователями как руководства в практической работе. Наряду со стандартными подходами этот раздел содержит ряд уникальных методик, непосредственно разработанных автором.

Около половины диссертации отведено под главу 3 «Результаты и обсуждение». Глава состоит из четырех разделов, каждому из которых соответствует определенный раздел в обзоре литературы, что весьма удобно для читателя.

В первом разделе главы А.А. Малыгин приводит результаты своей работы по получению функционально активных рекомбинантных рибосомных белков человека. Эта работа – базис всех последующих экспериментов, ведь без наличия объектов исследований, причем в препаративных количествах, дальнейшая работа была бы невозможна. Для экспрессии была выбрана чрезвычайно популярная система на основе вектора рЕТ-15b и штамма *E. coli* BL21(DE3). В результате были получены 11 высокоочищенных препаратов рекомбинантных рибосомных белков со встроенной N-концевой гексагистидиновой последовательностью (His₆-tag), удобной для их очистки с помощью аффинной хроматографии. Далее была разработана процедура очистки этих

белков из телец включения, предусматривающая рефолдинг. Таким образом, была разработана универсальная платформа для получения рекомбинантных рибосомных белков человека, что создало необходимую базу для дальнейших исследований. Следующий этап – доказательство близости структур рекомбинантных и нативных белков представляется более сложным. Анализируя спектры КД для трех из одиннадцати полученных белков, в сравнении со структурами соответствующих белков в составе рибосомы человека (чья структура расшифрована в 2013 г.), автор делает вывод о значительном структурном соответствии между нативными и рекомбинантными белками. Следует отметить, однако, что эти выводы, на мой взгляд, неоднозначны. На основании спектров КД для трех белков сделаны следующие выводы: а) «ренатурированные рибосомные белки человека обладают выраженной пространственной структурой» (повторяю, что речь идет только о трех белках: uS15, uS9 и uS13) и б) «учитывая, что содержание элементов вторичной структуры в рекомбинантных рибосомных белках uS15, uS9 и uS13 человека, в общем, соответствует содержанию этих элементов в структурах гомологичных белков прокариот, можно заключить, что фолдинг этих белков соответствует фолдингу их природных форм». При этом данные о вторичных структурах прокариотических белков не приводятся – хорошо было бы привести такое сравнение, например в виде таблицы. По другим белкам таких сравнений, судя по всему, не проведено. Между тем в следующем разделе, где речь идет о взаимодействиях отдельных белков с РНК, все это вместе с обсуждением возможного влияния His6-tag (который, будучи положительно заряженным, безусловно, способен вносить вклад во взаимодействие с отрицательно заряженной РНК) могло бы иметь существенное значение.

Следующий раздел главы посвящен исследованиям структурных основ взаимодействий рибосомных белков с 18S рРНК и её фрагментами. Актуальность этого раздела определяется, в первую очередь тем обстоятельством, что проблема полной сборки *in vitro* рибосомных субчастиц млекопитающих, как и эукариот вообще, на сегодняшний день не решена. В связи с этим во многих лабораториях предпринимаются попытки исследовать изолированные взаимодействия между отдельными компонентами эукариотической рибосомы. Плодотворность такого подхода, особенно после расшифровки пространственной структуры эукариотической рибосомы в 2013 г может быть предметом обсуждения, однако в защиту автора можно отметить, что его работы были выполнены до появления упомянутой структуры, а их результаты в целом не противоречат этим данным. Среди наиболее интересных результатов этого раздела можно упомянуть установление того факта, что участки связывания универсальных рибосомных белков на 18S рРНК, в целом, эволюционно консервативны. Фрагменты белков, не

имеющие гомологии в соответствующих белках эубактерий, либо образуют дополнительные контакты с 18S рРНК, участвуя тем самым в формировании структуры рибосомы, либо остаются свободными, что позволяет им участвовать во взаимодействии с лигандами рибосомы – факторами трансляции. В дополнение к этому, диссертант доказал независимый характер сборки морфологической части 40S субчастицы рибосомы – головы, включающей большой 3'-концевой домен 18S рРНК. Кроме того, он показал, что гидроксильное модифицирование рибосомного белка uL2 человека по остатку His216 может играть ключевую роль в поддержании функционально активной структуры рибосомы, способствуя конформационным перестройкам 28S рРНК, делающим её структуру такой, как в зрелых 60S субчастицах.

Следующий раздел главы посвящен исследованиям роли рибосомных белков 40S субчастицы в инициации трансляции геномной РНК вируса гепатита С (ВГС). Как известно, инициация трансляции этой РНК происходит с IRES-элемента, локализованного в 5'-нетранслируемой области генома вируса. К моменту выполнения работы А.А. Малыгиным в нескольких группах уже велись такого рода исследования: было получено представление о структуре комплекса IRES с 40S субчастицей и определены отдельные белки, контактирующие с IRES в этом комплексе. Однако конкретная роль структурных элементов 40S субчастицы в образовании комплекса, и, следовательно, в молекулярном механизме процесса переподчинения аппарата трансляции человека для синтеза собственного полипротеина вируса оставалась неясной.

Для исследований взаимодействия белков 40S субчастиц с IRES ВГС автором были получены три РНК-транскрипта, один из которых соответствовал IRES ВГС, а два других являлись его укороченными формами (в качестве замечания можно отметить, что на рис. 7 автореферата приведено четыре транскрипта; так все-таки три или четыре?!). Использование этих инструментов в экспериментах по футпринтингу, флуоресцентному мечению 40S субчастиц по остаткам лизина, а также масс-спектрометрическому анализу позволили существенно продвинуться в понимании процессов IRES-зависимой трансляции ВГС. Так, было показано, что в белках eS1, eS10 и eS27, не имеющих эубактериальных гомологов, остатки лизина прямо вовлечены в связывание с вполне определенными структурными элементами IRES, причем белкам eS1 и eS27 принадлежит определяющая роль в связывании IRES ВГС на начальной стадии инициации трансляции. Автор также впервые показал непосредственное взаимодействие IRES с 18S рРНК и, возникающие вследствие этого последующие структурные перестройки в последней. В результате А.А. Малыгиным был предложен молекулярный механизм, обеспечивающий селекцию инициаторной Met-tRNA_i^{Met} IRES-связанными 40S субчастицами, в основе

которого лежат конформационные перестройки 18S рРНК. Характерно, что многие из полученных в работе А.А. Малыгина данных нашли подтверждение при выполненном впоследствии исследовании структуры комплекса IRES ВГС с 40S субчастицей методом крио-ЭМ.

Заключительная, четвертая часть работы А.А. Малыгина была посвящена исследованиям роли рибосомных белков человека в регуляции собственного биосинтеза. Как известно, экзон-интронная структура генов высших эукариот и сплайсинг пре-мРНК расширяет возможности регуляции экспрессии этих генов. Хорошо известна, в частности, регуляция экспрессии генов посредством сплайсинга, основанная на принципе обратной связи, когда продукт экспрессии гена, белок, влияет на эффективность сплайсинга собственной пре-мРНК. Автор впервые провел систематическое исследование такого влияния на генах рибосомных белков человека, используя полученный им набор рекомбинантных рибосомных белков. В результате долгой и кропотливой работы А.А. Малыгин обнаружил новый способ авторегуляции экспрессии генов рибосомных белков человека, в основе которого лежит способность этих белков связываться с консенсусными участками сплайсинга в первом интроне кодирующих их пре-мРНК, и тем самым ингибировать вырезание этого интрона. При этом оказалось, что консенсусные участки связывания для разных рибосомных белков могут различаться. Автор делает предположение, что эти белки узнают свои участки на разных видах РНК по принципу структурной мимикрии. Это предположение, на мой взгляд, вполне имеет право на существование, однако нуждается в дополнительной проверке.

Резюмируя, можно утверждать, что работа Малыгина А.А. выполнена на высоком экспериментальном и научном уровнях. Достоверность результатов работы и обоснованность выводов не вызывают сомнения.

Работа А.А. Малыгина хорошо оформлена, написана ясным научным языком и успешно проиллюстрирована. Содержание автореферата диссертации полностью соответствует содержанию работы. Подавляющее большинство полученных результатов являются новыми и потому имеют высокую актуальность, фундаментальную значимость и научную новизну. Учитывая указанную выше важность проведенных исследований для создания новых антибиотиков, высокая практическая значимость диссертационной работы не вызывает сомнения. Сделанные по работе замечания не носят принципиального характера и не влияют на основные результаты и выводы диссертации.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена в 26 научных статьях, опубликованных автором в ведущих

российских и зарубежных журналах, результаты работы доложены на отечественных и международных конференциях.

Диссертация Малыгина А.А. «Структурно-функциональные особенности взаимодействий рибосомных белков человека с различными видами РНК», полностью отвечает требованиям "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор, Малыгин Алексей Аркадьевич, заслуживает присуждения ему искомой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией
молекулярных основ действия
физиологически активных соединений
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной биологии им.
В.А. Энгельгардта Российской
академии наук, чл.-корр. РАН, д.х.н.

Кочетков Сергей Николаевич



ГСП-1, 119991, г. Москва, ул.
Вавилова, д. 32.
Тел: +7 (499) 135-23-11
E-mail: kochet@eimb.ru

Подпись Кочеткова Сергея Николаевича заверяю

Ученый секретарь ФГБУН ИМБ РАН
к.в.н. Бочаров А.А.



23.10.2018