

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию 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.

Диссертационная работа А.А. Малыгина посвящена исследованию одной из фундаментальных структур клетки. Рибосома представляет собой универсальную машину по декодированию генетической информации, но даже ее базовая структурная организация во многом остается неясной. Более того, это очень сложная динамическая РНК-белковая система, способная существовать в разных конформационных состояниях и являющаяся важным участником многих регуляторных контуров и процессов. Без ее детального изучения развитие современных представлений о биологии клетки невозможно, что и позволяет мне оценить направление работы диссертанта как фундаментально значимое.

Также хочу отметить, что рибосома является одной из обязательных структур клетки, и ее появление было одним из ключевых этапов возникновения жизни в ее существующем виде. В то же время, возникновение рибосомы в ходе эволюции является одной из загадок, без решения которой сам этот процесс не может быть полноценно описан. В природе нет организмов, несущих промежуточные варианты эволюционно-ранних «полуфабрикатов» рибосом, поэтому их эволюцию можно только моделировать на основе глубокого анализа собственно процесса формирования РНК-белковых комплексов субъединиц рибосомы и сравнительного анализа этих процессов у эубактерий, архей и эукариот.

Долгое время исследования проводили в основном на прокариотических рибосомах, тем более что их субъединицы можно собирать из рРНК и рибосомных белков *in vitro*. Рибосомы эукариот и, особенно, млекопитающих, вследствие особенностей их организации оставались (относительно) малоизученными. Однако, их исследование необходимо и для выявления особенностей протекания базового процесса трансляции, и для реконструкции регуляторных систем, определяющих эффективность трансляции на глобальном уровне и в случае каких-то конкретных мРНК. Конкретная тематика диссертационной работы посвящена изучению роли рибосомных белков человека при формировании субъединиц рибосомы, а также в специфических для эукариот процессах трансляции IRES-содержащих мРНК и контроля эффективности сплайсинга собственных пре-мРНК. Это позволяет определить тематику работы диссертанта как весьма актуальную.

Структура работы. Работа изложена на 283 страницах В диссертации присутствуют следующие разделы: список сокращений (2 стр.), введение (8 стр.), содержащее описание целей и задач, обзор литературы (глава 1 «Структурно-функциональные свойства рибосомных белков млекопитающих») (70 стр.), материалы и методы исследований (29 стр.), результаты и обсуждение (127 стр.), заключение (5 стр.), выводы (2 стр.), список литературы (29 стр.) и благодарности (1 стр.).

Введение содержит убедительное описание актуальности решаемой проблемы, что в данном случае было достаточно просто сделать, учитывая фундаментальную значимость рибосомы для всех клеточных процессов. Представляется неудачным использование термина «незначущая последовательность» применительно к интронам, более правильно было бы использовать термин «некодирующая», т.к. в интронах часто содержатся сайты связывания регуляторных факторов и иные регуляторные сигналы.

Цель и задачи работы. Автор определил цель работы как «изучение структурных особенностей взаимодействий рибосомных белков человека с разными типами РНК, лежащих в основе различных клеточных процессов, не связанных непосредственно с трансляцией клеточных мРНК». Собственно говоря, цель совпадает с названием. По-видимому, автор имел в виду то, что не исследовал взаимодействие рибосомных белков с мРНК собственно во время разных фаз процесса трансляции - линейного сканирования, ассоциации субъединиц, элонгации и терминации трансляции.

Сформулировано 7 задач, основные задачи диссертационной работы можно определить как изучение функций рибосомных белков человека на нескольких моделях:

- (1) в составе рибосомы – как составных частей базовой структурной организации этого сложного РНК-белкового комплекса в его разных аспектах и искусственно выделенных промежуточных состояниях (задачи 1-5);
- (2) в процессе взаимодействия 40S субъединицы рибосомы и сегмента геномной РНК вируса гепатита человека (задача 6);
- (3) в процессе регуляции экспрессии генов рибосомных белков на уровне сплайсинга их пре-мРНК (задача 7).

С моей точки зрения, разделы «Научная новизна» и «Теоретическая и практическая значимость работы» достаточно адекватно отражают вклад автора в данную область науки.

Обзор литературы включает три подраздела и в нем приведено описание рибосомных белков, которое можно оценить как практически всеобъемлющее – классификация, структура генов и контроль их экспрессии, импорт в ядро из цитоплазмы, участие в структуре субъединиц рибосомы, в процессе трансляции специфических и вирусных мРНК, а также функции отдельных рибосомных белков, не связанные с процессом трансляции или рибосомой («экстрарибосомные»). Обзор написан грамотно, с глубоким знанием и пониманием проблемы, читать его интересно. Раскрыто современное состояние дел и сформулированы текущие вопросы и фундаментальные проблемы, в том числе те, которыми занимается автор. С моей точки зрения, не хватает заключения по обзору литературы, в котором была бы подчеркнута актуальность и значимость поставленных в диссертации целей и задач для науки на тот момент, когда они выполнялись.

Замечания к обзору литературы: Не вполне понятен смысл применения термина «псевдоген» для генов, кодирующих рибосомные белки (безинтронные кДНК копии, встроенные в различные участки генома). Обычно этот термин применяют в тех случаях, когда ген становится не функциональным вследствие накопления мутаций (рамка считывания содержит нонсенс-кодоны, отсутствует транскрипция и т.п.). Если такая копия гена экспрессируется и является потенциально функциональной (о таких случаях автор пишет в соответствующем разделе), то это скорее паралог или функциональный аналог гена рибосомного белка, «псевдоген» как функциональную единицу обычно не рассматривают. Есть несколько неудачных переводов английских терминов («ядерный

импорт рибосомных белков»), некоторое (небольшое) число ошибок и опечаток, но в целом работа написана очень грамотно.

Глава «**Материалы и методы**» почему-то имеет отдельное название и в скобках несет уточняющий комментарий «экспериментальная часть». Я не нашел в работе «теоретической части» методов (хотя автор активно и к месту использовал компьютерный анализ, про это есть раздел 2.2.23), наверное планировалось его также описать? Раздел написан очень подробно и с многочисленными деталями, вплоть до состава типовых буферов. В целом, основные методы основаны на использовании рекомбинантных рибосомных белков, химическом и ферментативном футпринтинге РНК-белковых комплексов, сплайсинге *in vitro*, масс-спектрометрии и т.д. – то есть методическая часть была вполне адекватной поставленным задачам и существовавшим на момент проведения работы методическим возможностям, которые и сегодня соответствуют высокому уровню проведения экспериментов.

Глава «**Результаты и обсуждение**». Первый раздел главы посвящен наработке рекомбинантных рибосомных белков человека. Эта проблема методически не является простой, так как многие белки могут негативно влиять на рост бактерий, синтезируются в форме телец включения (нерастворимых) и для растворения необходима денатурация и последующий фолдинг. Кроме этого, нуклеотидные последовательности эукариотических белок-кодирующих частей мРНК отличаются по частотам синонимических кодонов от бактериальных, вообще это видоспецифическая характеристика и кластеры редких кодонов могут снижать уровень синтеза рекомбинантного белка. Эффективность трансляции мРНК в бактериях в существенной степени зависит от вторичной структуры 5'-концевой части молекулы, в особенности в районе сайта Шайна-Дальгарно, и эффективная наработка некоторых эукариотических белков не всегда является выполнимой задачей. Тем не менее, автору удалось преодолеть методические сложности и решить эту задачу (в том числе с помощью внесения изменений в кодонный состав соответствующих CDS), причем корректность фолдинга была подтверждена с помощью сравнения физико-химических характеристик белков, что подтвердило и сопоставление с современными данными рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии. Это составило основу для дальнейших исследований.

Второй раздел описывает исследование процесса сборки субъединиц рибосом, в частности выполненное на одном из структурных элементов 40S субъединицы («голове»). Вообще это очень интересная проблема, т.к. рибосома является РНК-белковым комплексом, возникшем в самом начале формирования живых систем, и возможность самосборки этого комплекса в силу закономерностей его организации представляется и естественным условием стабильности процесса, и следствием этой ранней эволюционной истории. Для рибосом бактерий и архей такая самосборка была получена *in vitro* и это дало ценную информацию о последовательности формирования итоговой структуры субъединиц, однако для рибосом эукариот это оказалось невозможно. Считалось, что одна из причин заключается в большом и сложном аппарате дополнительных факторов, сопровождающих процесс последовательного взаимодействия рибосомных белков с доменами рРНК и конформационных переходов РНК-белкового комплекса до его конечного состояния. Автору удалось получить такую информацию для одной из относительно структурно выделенных частей 40S субъединицы и было показано, что в целом процесс сходен с таковым у прокариот, несмотря на ряд существенных различий в структурах белков и

pРНК. В этой части работы также была получена новая информация о структуре 40S субъединицы млекопитающих, местах контактов ряда рибосомных белков с pРНК и друг с другом, о тонкой организации РНК-белкового комплекса и уточнена последовательность его сборки. Это биологически значимый результат, внесший вклад в формирование представлений о структуре рибосомы и процессе ее формирования. Особое уважение вызывает широкий методический арсенал, примененный автором для подтверждения полученных результатов (различные методы анализа – футпринтинг, мутантные формы РНК и белков, анализ посттрансляционных модификаций рибосомных белков и т.д.). Стоит подчеркнуть, что большая часть полученных результатов была подтверждена в последующих работах, выполненных с применением новых технологий.

Третий раздел диссертационной работы посвящен изучению взаимодействия рибосомных белков и сайта связывания рибосом (IRES) вируса гепатита С. Вообще IRES являются одним из активно исследуемых трансляционных сигналов, но об их структуре и спектре функций нет определенной точки зрения и до сих пор ведутся бурные и очень эмоциональные дискуссии, в особенности это касается потенциальных IRES в структуре клеточных мРНК. Считается, что присутствие таких сайтов позволяет мРНК транслироваться в условиях снижения эффективности кеп-зависимой инициации трансляции и это создает новый дополнительный уровень трансляционной регуляции экспрессии генов. Хотя структура и функции IRES в структуре клеточных мРНК не ясны, вирусные IRES исследуются давно, собственно этот вид сигналов и был открыт при изучении пикорнавирусов. Они характеризуются большими размерами и сложной структурой и являются значимой частью в обеспечении жизненного цикла вирусов, белки которых нарушают кеп-зависимую трансляцию и переключают клеточный аппарат экспрессии на свои нужды. Особый интерес эти исследования представляют для развития представлений о тонкой структуре рибосомы и особенностях ее функционирования, т.к. изучение взаимодействия с IRES может дать новую и очень ценную информацию, дополняющую результаты исследования конвенциональной кеп-зависимой инициации трансляции. Автором была реконструирована структура комплекса 40S субъединицы и сегмента IRES ВГС и с моей точки зрения был получен крайне интересный результат о важности белка uS2 в этом процессе. Нужно отметить, что этот белок выполняет важные экстрарибосомные функции и его содержание в собранных 40S-субъединицах может варьировать в зависимости от интенсивности трансляции (чем выше интенсивность, тем больше стехиометрическое содержание этого белка). С моей точки зрения этот факт является ярким подтверждением усложнения структуры эукариотической рибосомы в плане увеличения спектра возможностей для регуляции процесса трансляции. Автор подтвердил эту закономерность для рибосом человека (раздел 3.2.4), установил его локализацию на рибосоме и функциональную роль эукариот-специфического С-концевого домена. В работе со связыванием 40S субъединицы рибосомы человека и IRES ВГС диссертантом было установлено, при низком содержании белка uS2 в рибосомах это взаимодействие было супрессировано, при этом важную роль также играл С-концевой домен. Работа диссертанта позволила связать специфический для эукариот механизм инициации трансляции через внутренние сайты связывания рибосом и один из новых эукариот-специфических доменов рибосомных белков, что очень интересно и значимо. Далее в этой части работы представлены результаты картирования связывания IRES-содержащей РНК с белками на поверхности рибосомы (для этого был использован

подход, основанный на модификации положительно заряженных остатков лизина) и разработана структурная модель, описывающая конформационные изменения РНК-белкового комплекса 40S субъединицы рибосомы, приводящие к позиционированию стартового кодона открытой рамки считывания полипротеина ВГС в позиции, соответствующей А-сайту – причем без участия факторов аппарата инициации трансляции, работающих в кеп-зависимой инициации. Дополнительно стоит отметить оценку робастности этого взаимодействия: обычно предлагаемые модели схематичны и рассматриваются упрощенно, как нечто устойчивое и однозначное, хотя в биологических системах это случается не так часто. В данном случае анализ позиционирования кодона AUG открытой рамки считывания полипротеина в гРНК ВГС показал, что существует набор конформаций с разными положениями 40S субъединицы относительно стартового кодона, только часть из которых функциональна, то есть процесс имеет вероятностный характер. По-видимому, достаточная эффективность достигается за счет разрушения eIF-4G и переключения клеточных ресурсов на трансляцию вирусных мРНК.

Последний раздел главы «Результаты и обсуждение» содержит описание роли рибосомных белков в контроле их синтеза. Поскольку стехиометрические соотношения рибосомных белков важны для корректной сборки рибосомы, существует необходимость в надежной регуляции уровня экспрессии соответствующих генов. Несмотря на важность транскрипционного контроля, в эукариотических клетках часто используется контроль на других стадиях процесса экспрессии (сплайсинг пре-мРНК, цитоплазматическая стабильность мРНК, эффективность инициации трансляции, стабильность белка (регулируемый протеолиз) и т.д.). Известно, что трансляционная активность мРНК рибосомных белков регулируется через mTOR и более активна в делящихся или растущих клетках. Существуют также варианты специфических механизмов, основанных на отрицательной обратной связи – если конечный продукт экспрессии гена (белок) имеется в избытке, то он связывается с собственной пре-мРНК или мРНК и ингибирует сплайсинг или трансляцию, соответственно. Автором было проведено исследование процесса экспрессии генов uS15 и uS9 и доказано, что эти белки способны связываться с пре-мРНК в районе консервативных нуклеотидов донорного и акцепторного сайтов сплайсинга первого интрона, то есть при их избыточном количестве в ядре они специфически ингибируют собственный синтез. Более того, эти сайты, вероятно, сходны с сайтами в рРНК, к которым эти белки имеют сродство («структурная мимикрия»). Нужно, тем не менее, отметить, что проблема реконструкции сигналов в РНК достаточно сложна методически: обычно эти сигналы представляют собой вырожденные элементы первичной структуры в комбинации с элементами вторичной и третичной структуры, с чем хорошо знаком автор при реконструкции РНК-белковых комплексов в составе рибосомы. Однако выявление сигналов в составе мРНК является более сложной задачей. мРНК в растворе существует в виде набора конформаций с близкой термодинамической стабильностью, на соотношение которых в цитоплазме или ядре клетки в существенной степени влияют белки, связывающиеся с этой матрицей. Предсказать их реальную структуру *in vivo* на основе моделей *in vitro* и программ фолдинга часто очень трудно, хотя в последнее время появились высокопроизводительные экспериментальные подходы, основанные на NGS и выделении структурированных участков с помощью РНКаз, специфичных для одноцепочечных участков молекул. С моей точки зрения, оценки автора в этой части работы больше носят оценочный характер и выявление структуры сигнала требует

специальных экспериментов, что связано со сложностью проблемы. Это, однако, в меньшей степени касается рибосомной РНК и ее взаимодействий, обусловленных специально организованными структурными элементами и учитывающей взаимодействие с белками.

Раздел «**Заключение**» кратко суммирует полученные результаты и акцентирует их вклад в общее состояние исследований в данной области науки. В качестве пожелания - хотелось бы, чтобы в этом разделе автор дополнительно кратко выделил бы наиболее важные возможные перспективы использования достижений его работы как в развитии фундаментальных исследований аппарата трансляции человека, так и в поиске путей противодействия заболеваниям, связанным с дисфункцией рибосомных белков.

Раздел «**Выводы**» содержит 7 таковых, что совпадает с числом задач. Выводы соответствуют результатам работы, хотя в некоторых случаях формулировки, наверное, излишне развернуты.

Заключение: Всё вышеизложенное позволяет заключить, что диссертационная работа А.А. Малыгина является завершённой научно-квалификационной работой, фундаментальный характер, актуальность, новизна и значимость которой не вызывают сомнений. Полученные результаты являются новыми, и выводы диссертации вытекают из полученных результатов. Автореферат отражает содержание работы. Материал диссертации соответствует указанной специальности. Диссертация апробирована на международных конференциях, результаты опубликованы в авторитетных международных научных журналах. В целом, диссертационная работа А.А. Малыгина является крупным научным достижением, где автором решена важная научная проблема, связанная с фундаментальным исследованием роли рибосомных белков человека в формировании элементов структуры рибосомы, трансляции вирусных РНК и во внерибосомных процессах. Таким образом, диссертационная работа А.А. Малыгина полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук (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 01.10.2018 № 1168), а ее автор, Малыгин Алексей Аркадьевич, заслуживает присуждения степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

Кочетов Алексей Владимирович
доктор биологических наук
чл.-корр. РАН
директор ФГБНУ «Федеральный исследовательский
центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»
(ИЦиГ СО РАН)



630090 г. Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 10
Тел. 8383-3634980
director@bionet.nsc.ru