

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.

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ: Диссертационная работа Алексея Аркадьевича Малыгина посвящена комплексному многостороннему исследованию структуры и функции рибосомных белков человека. Хотя структура рибосом исследована сейчас весьма подробно, в данной области остаются существенные пробелы, в первую очередь связанные именно со структурами человеческих рибосом, неотъемлемым компонентом которых являются рибосомные белки. Функциональная роль рибосомных белков не ограничивается только канонической их функцией при трансляции клеточных мРНК. Чрезвычайно важной является понимание их роли в процессах трансляции вирусных мРНК, несущих участки внутренней посадки рибосом (IRES). Более того, совершенно новой, по крайней мере, для рибосомных белков человека, является их участие в управлении своим собственным синтезом, осуществляющимся по механизму отрицательной обратной связи. Особенностью некоторых рибосомных белков также является их гидроксилирование, функция которого также исследована в данной работе.

Работа посвящена всеобъемлющему исследованию функции рибосомных белков как структурных компонентов рибосомы при синтезе клеточных белков, а также вирусных белков при IRES-опосредованной инициации трансляции. Интереснейший раздел работы посвящен изучению влияния рибосомных белков человека на сплайсинг их пре-мРНК.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА: В работе применен широчайший набор биохимических методов изучения РНК-белковых взаимодействий, налажена схема получения рекомбинантных рибосомных белков, созданы системы сборки в пробирке как бинарных и тройных комплексов рибосомных белков с фрагментами РНК, так и целых функциональных частей/доменов рибосомных субчастиц. Совокупность методов химического и ферментативного пробинга, а также связывания на нитроцеллюлозных фильтрах и ультрацентрифугирования позволила выделить как средство отдельных рибосомных

белков к РНК и кооперативность их связывания, так и молекулярные детали взаимодействия белков с РНК.

Все результаты, полученные в работе, являются новыми, впервые полученными и опубликованными автором в научных журналах высокого международного уровня.

Во-первых, автором впервые была разработана и широчайшим образом применена методология получения большого набора рекомбинантных рибосомных белков. Проведена подробная характеристика их структуры и сворачивания, проведен сравнительный анализ характеристик рибосомных белков, выделенных из рибосомы и полученных в результате экспрессии в гетерологичной системе.

Во-вторых, исследована стабильность взаимодействия рибосомных белков человека с рибосомной РНК. При этом обнаружилось значимые отличия от подобных взаимодействий в бактериальной системе.

В-третьих, для репрезентативного набора рибосомных белков впервые исследованы молекулярные механизмы их взаимодействия с фрагментами рибосомной РНК.

В-четвертых, впервые исследована функциональная роль необычной модификации, гидроксирования, рибосомного белка uL2.

В-пятых, автору диссертации впервые удалось реконструировать в пробирке целый структурный домен малой субчастицы рибосомы человека. Надо сказать, что реконструкция человеческой рибосомы до сих пор представляет собой нерешенную задачу. В живой клетке для сборки рибосом применяются сотни специализированных белковых и РНК факторов. Даже реконструкция отдельного домена рибосомной субчастицы является шагом вперед для всего сообщества рибосомологов.

В-шестых, проведен тщательный анализ взаимодействий рибосомных белков с IRES вируса гепатита С. Этот опасный вирус представляет одну из важнейших угроз человечеству. Любые новые данные о механизмах экспрессии его генов представляет собой большой шаг вперед к возможности лечения этого заболевания.

В-седьмых, для рибосомных белков человека впервые показано участие в регуляции экспрессии собственных генов с помощью ингибирования сплайсинга пре-мРНК по механизму отрицательной обратной связи, ранее известной только для рибосомных белков дрожжей.

Таким образом, в работе, безусловно, присутствует новизна исследования. Все результаты исследования оригинальны и интересны для научного сообщества.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ: Диссертационная работа Алексея Аркадьевича Малыгина представляет несомненный практический интерес. В первую очередь, практический интерес представляют исследования особенностей сборки инициаторных комплексов на IRES элементе мРНК вируса гепатита С и отличиях в инициации трансляции на мРНК ВГС от канонических клеточных мРНК. Вирус гепатита С является важным социально значимым заболеванием. По данным Всемирной Организации Здравоохранения в мире 130–150 миллионов человек больны ВГС. Ежегодно, от последствий этого заболевания умирает до 700 тысяч человек. Потенциально, проведенные Алексеем Аркадьевичем Малыгиным исследования, вместе с результатами работы других авторов, вносят важный вклад в понимание отличий вирусной и клеточной инициации трансляции. В будущем, такие исследования могут привести к созданию противовирусных препаратов нового поколения.

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 биохимии.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ: Диссертация Алексея Аркадьевича Малыгина написана по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Диссертация изложена на 283 страницах машинописи и содержит 86 рисунков и 6 таблиц. Список цитируемой литературы состоит из 369 источников отечественных и зарубежных авторов.

Обзор литературы посвящен всеобъемлющему анализу имеющихся сведений о рибосомных белках человека. При этом обсуждается подробно номенклатура рибосомных белков, структурная организация рибосомных белков и их генов. Особое внимание в обзоре литературы посвящено регуляции экспрессии генов рибосомных белков на уровне транскрипции и в особенности сплайсинга, что является важнейшей темой, подготавливающей читателя к пониманию вопросов, решаемых в части «Результаты и их обсуждение». Помимо транскрипции и сплайсинга пристальное внимание уделено трансляции мРНК, кодирующей рибосомные белки. Разобран механизм функционирования mTORC сигнального пути и его влияние на трансляцию TOP-

содержащих мРНК, к числу которых принадлежит большинство мРНК, кодирующих рибосомные белки. Автор также обращает внимание читателя на болезни, связанные с рибосомными белками. Наконец, достаточно много внимания уделено трансляции вирусных мРНК, содержащих различные типы IRES элементов и участие рибосомных белков в узнавании IRES элементов. Среди внерибосомных функций рибосомных белков автор уделяет внимание и репарации ДНК, и сигнальным путям и даже роли внеклеточных рецепторов. Поистине, разнообразие функций рибосомных белков поражает воображение.

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.

Экспериментальная часть диссертации написана очень 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 в области биосинтеза белка и вообще ведущих исследования взаимодействия РНК и белков.

В главе “Структурно-функциональные особенности взаимодействий рибосомных белков человека с различными видами РНК (Результаты и 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.

Работа начинается с создания платформы для приготовления рибосомных белков в достаточном количестве и с достаточной степенью чистоты при сохранении, что самое важное, их функциональной активности. Оставляет самое хорошее впечатление та ответственность, с которой автор подходит к доказательству функциональности белков, использованных в дальнейшей работе.

Затем автор переходит к фундаментальному свойству взаимодействия рибосомных белков с рибосомной РНК. Исследуется устойчивость рибосомных субчастиц к отщеплению белков. Для этого применяется оригинальный метод отщепления в градиенте концентрации ионов лития. Интересный результат этого раздела работы – выявленное

отличие в стабильности ассоциации рибосомных белков человека и бактерии с соответствующими рРНК.

Важную часть работы занимает изучение взаимодействий целого спектра рибосомных белков с фрагментами рРНК, выполненное в основном при помощи химического и ферментативного футпринтинга и других методов. В этом разделе имеются свои находки, связывающие структурные изыскания с функциональными характеристиками. Так, безусловно, изюминкой работы является реконструкция головы малой субчастицы рибосомы в пробирке. Среди других находок – синергия в связывании рибосомных белков uS7 и uS9 с головой малой субчастицы. Найденные особенности отличают рибосому человека от бактериальной рибосомы.

Интересная часть работы связана с изучением функциональной роли гидроксирования рибосомного белка uL2. Автор использует сравнение комплексов фрагмента рРНК с рекомбинантным и нативным, выделенным из рибосом белком uL2, которые, соответственно немодифицированы и гидроксированы.

Повышенную практическую значимость имеет раздел, посвященный изучению роли рибосомных белков во взаимодействии с рибосомой мРНК одного из патогенных вирусов человека, вируса гепатита С. По результатам работы сделаны важные выводы, объясняющие роль рибосомного белка uS7 в структурных перестройках, происходящих с комплексом IRES/малая субчастица при инициации трансляции.

Наконец, особую новизну имеют работы автора по изучению механизма регуляции сплайсинга пре-мРНК рибосомных белков избытком рибосомных белков, не связавшихся со своим основным партнером, рибосомной РНК.

Работа Алексея Аркадьевича Малыгина “Структурно-функциональные особенности взаимодействий рибосомных белков человека с различными видами РНК” выполнена на высочайшем научном уровне. Об этом свидетельствует не только текст и иллюстрации самой диссертации, но и убедительный список публикаций автора в престижных международных журналах. По результатам работы опубликовано 26 статей в отечественных и международных журналах, включая несколько статей 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. Работа содержит исчезающе малое количество опечаток и неудачных

выражений. Я привожу их в отзыве только как доказательство того, что внимательно прочитал работу:

Стр. 189. ... а также два дополнительных остатками гуанозина...

Стр. 209. ...триплет CCC образует комплементарную пару с триплетом GGG...

Считается не вполне правильным говорить **степень гомологии**, поскольку гомология это общее происхождение, которое не измеряется количественно. Разумно было бы заменить это выражение степенью **сходства** последовательностей. Хотя, по моему мнению, степень гомологии уже настолько укоренилась в научной литературе, что ее можно было бы уже признать вполне нормальным выражением.

Кроме перечисленных замечаний я хотел бы остановиться на нескольких тонких местах в постановке и интерпретации результатов экспериментов.

1. Метилирование N7 атома гуанозина, возможно и приводит к замедлению обратной транскриптазы (стр. 137), все-таки эту модификацию лучше выявлять с помощью обработки борогидридом натрия/анилином.
2. Роль гидроксирования uL2 исследовалась при сопоставлении комплексов фрагмента рРНК с нативным (гидроксированным) и рекомбинантным (негидроксированным) белком. Вообще говоря, белки, получаемые столь разными способами, могут иметь и другие отличия, например, рекомбинантный белок может иметь формилметионин на N-конце. Самое правильно было бы сравнивать рибосомы из линий клеток с интактным и инактивированным геном фермента, отвечающего за гидроксирование.
3. В опыте по реконструкции головы малой субчастицы результаты применения пробинга реконструированной частицы сравнивали со структурой рибосомы, делая предположения о том, какие нуклеотиды должны защищаться от модификации. Более правильно было бы сравнить экспериментальные результаты пробинга нативной 40S субчастицы и реконструированной головы. Тогда было бы совсем правомерно говорить об одинаковой структуре.
4. Белковый футпринтинг с защитой от модификации NHS эфиром флюорофора Cu₃, примененный для картирования контактов (стр. 201 и далее) IRES вируса гепатита С с рибосомой, метод чрезвычайно интересный. Проблема в том, что множество остатков лизина, не все из которых защищаются от модификации, может препятствовать картированию контактов. Более того, в ряде случаев полоса на геле, интенсивность которой падает при связывании IRES, содержит несколько белков. Отбрасывание нескольких из них на основе других данных, не имеющих отношения к данному

эксперименту, может немного снижать ценность применения метода. Может быть, можно было бы, например, иммунопреципитировать белки после модификации и измерить флюоресценцию индивидуальных белков по отдельности.

5. Много вопросов вызывают эксперименты по изучению регуляции сплайсинга пре-мРНК рибосомных белков. Странно, что конструкции, кодирующие рибосомный белок uS15, называются S13. Даже с учетом изменения номенклатуры, было бы хорошо привести наименования либо к старой, либо к новой номенклатуре единообразно. Для доказательства механизма регуляции с отрицательной обратной связью *in vivo* используется сравнение конструкции содержащей и не содержащей интрон (рис. 77). Это сравнение в приведенном виде не вполне правомерно. Пониженный уровень мРНК интронированной конструкции может говорить, например, просто о меньшей эффективности экспрессии. Для вывода о регуляции совершенно необходимо расцепить репортерный ген с интроном или без и экспрессирующую систему, продуцирующую сам белок, т.е. смотреть уровень сплайсинга одной и той же пре-мРНК в условиях искусственно пониженной и повышенной концентрации белка. Не вполне иллюстративно выглядят рисунки 78Д (результаты иммунопреципитации) и 80. На последнем приведены продукты *in vitro* сплайсинга. Интересно, почему количество пре-мРНК S13INT не увеличивается при максимальном уровне uS15, а количество пре-мРНК uS9 увеличивается?

Отмеченные недостатки не имеют, конечно, принципиального характера и не отражаются на общем хорошем впечатлении от работы. Выводы работы абсолютно обоснованы и мелкие недостатки никак не отражаются на значимости и ценности представленной работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Все вышеизложенное позволяет констатировать, что диссертация Алексея Аркадьевича Малыгина "Структурно-функциональные особенности взаимодействий рибосомных белков человека с различными видами РНК", представленная на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия, является законченным самостоятельным научным исследованием, в котором автором решена важная научная проблема, осуществлено создание научного направления исследований рибосомных белков. По актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация соответствует всем требованиям п. 9 "Положения о присуждении ученых

степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями от 21.04.2016 г. № 335; от 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор, Алексей Аркадьевич Малыгин без сомнения, заслуживает присуждения искомой степени доктора химических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

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



И.о. декана химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова
Чл. корр. РАН, профессор, д.х.н. Калмыков С.Н.