

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Шарифулина Дмитрия Евгеньевича «Пептиды рибосомных белков eS26, uS7 и uS3, участвующие в инициации трансляции у млекопитающих», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Процесс трансляции мРНК, который осуществляется на рибосомах, – это один из главных этапов реализации генетической информации (для белок-кодирующих генов). Рибосомы являются основным компонентом белоксинтезирующих аппаратов всех типов клеток. В целом на синтез белка, включая трансляцию мРНК и биогенез всех компонентов аппарата, затрачивается наибольшая часть материальных и энергетических ресурсов клеток. Поэтому в клетках существуют регуляторные механизмы, которые при стрессах обеспечивают «торможение» рибосомогенеза и синтеза большинства белков, за исключением тех, которые помогают сопротивляться стрессам. Другие «акселераторные» механизмы могут стимулировать рибосомогенез и усиливать синтез белков при наступлении благоприятных условий, что обеспечивает рост и деление клеток.

У эукариот большинство регуляторных механизмов оперируют на уровне инициации трансляции и реализуются через взаимодействие рибосом с различными клеточными мРНК, которые в значительной мере унифицированы, благодаря 5'-кэп структуре (m7Gppp...) и 4-ой группе факторов (eIF4E, -4G, -4F, -4A, -4B), а также 3'-поли(А) и поли(А)-связывающим белкам (РАВР). Вместе с тем, некоторые мРНК (особенно вирусные) не содержат и/или 5'-кэпа и/или 3'-поли(А), однако обладают уникальными структурно-функциональными элементами как в 5'-так и в 3'-нетранслируемых областях (5'- и 3'-НТО), которые обеспечивают эффективную инициацию трансляции (энхансеры, 5'CITE, 3'CITE, IRES, IGR и др.) при определенных условиях. Действие многих из этих элементов реализуется через взаимодействие с факторами инициации трансляции, активность которых может регулироваться фосфорилированием, а также через взаимодействие с рибосомными белками (гр), находящимися вблизи траектории мРНК-проводящего канала в малой рибосомной субчастице (40S RSU).

Диссертационная работа Шарифулина Д.Е. как раз посвящена изучению контактных участков рибосомных белков uS3, uS7 и eS26 в 40S RSU млекопитающих, которые взаимодействуют с мРНК-аналогами, а также с субъединицами факторов eIF2 и eIF3 в ходе инициации трансляции.

С помощью метода аффинной модификации рибосом реакционно-способными производными олигорибонуклеотидов (олигоРНК), которые использованы в качестве аналогов мРНК, автором систематически исследовано молекулярное окружение мРНК на входе (гр uS3), в средней части (гр uS7) и на выходе (гр eS26) из мРНК-проводящего канала в 40S RSU. В частности, установлено, что РНК-связывающий сегмент (аминокислоты 55-64) в консервативном домене гр uS3 экспонирован на поверхности 40S RSU вблизи участка входа мРНК и обеспечивает взаимодействие с мРНК еще до ее вхождения в проводящий канал. Кроме того, получены данные, свидетельствующие, что в составе 48S-преинициаторного комплекса (48S PIC), где субъединица j фактора eIF3 связана в мРНК-связывающем центре 40S RSU, этот сегмент гр uS3 теряет способность взаимодействовать с мРНК-аналогом, однако становится снова доступным после диссоциации eIF3j.

Здесь возникает вопрос: почему автор не использовал экспонированные мРНК-аналоги? Ведь практически все клеточные мРНК экспонированы и образуют комплексы с факторами 4-ой группы. При канонической экп-зависимой инициации трансляции 5'-конец мРНК с фактором eIF4E поступает в 40S RSU со стороны гр uS3, которому, вероятно, и передается для втягивания в мРНК-проводящий канал и дальнейшего сканирования. Представляется весьма интересным исследовать взаимодействие гр uS3 с экспонированными мРНК и факторами 4-ой группы.

Кроме того, автором показано, что сегмент аминокислот 62-70 гр eS26, который специфичен для эукариот, участвует в формировании мРНК-проводящего канала на отрезке от участков кодон-антикодоновых взаимодействий до выхода из рибосомы.

Далее с помощью формальдегидных сшивок диссертант установил, что в составе 48S PIC при узнавании стартового кодона мРНК тройным комплексом $\{GTP \cdot eIF2 \cdot Met-tRNA_i^{Met}\}$ α -субъединица фактора eIF2 сближена с нуклеотидом в положении -3 (относительно $A^{+1}U^{+2}G^{+3}$ стартового кодона), который также контактирует с гр uS7. Вместе с тем, сегменты 68-75 и 81-87 аминокислотной последовательности фактора eIF2 α контактируют соответственно с сегментами 2-18 и 72-85 у гр uS7, что оказалось сходным как для «стандартного» мРНК-аналога, так и для мРНК-аналога с IRES-элементом вируса гепатита С (HCV). Некоторые стерические несоответствия, возникшие при построении трехмерной модели с учетом обнаруженных взаимодействий, по мнению диссертанта, компенсируются значительной конформационной подвижностью контактирующих N-концевых доменов eIF2 α и гр uS7, которые сближаются за счет электростатических взаимодействий между кислыми и основными группами аминокислот.

Здесь имеются замечание и вопрос. Состав тройного комплекса лучше указывать как приведено мною выше, а не как в автореферате ($eIF2 \cdot Met-tRNA_i^{Met} \cdot GTP$) или в диссертации ($eIF2 \cdot GTP \cdot Met-tRNA_i^{Met}$), поскольку и GTP и $Met-tRNA_i^{Met}$ присоединяются к фактору eIF2 (причем GTP раньше), а не друг к другу.

Проводилась ли оценка степени фосфорилирования α -субъединицы фактора eIF2 по Ser51? Добавление гемина к лизату ретикулоцитов кролика (LPC) конечно препятствует активации гем-регулируемой киназы (HRI), однако не влияет на активность других киназ (GCN2, PERK) с той же субстратной специфичностью. Если некоторая часть молекул eIF2 α фосфорилирована по Ser51, это может вносить вклад в картину электростатических взаимодействий фактора с мРНК и гр uS7.

Весьма интересно провести в будущем эксперимент вообще без добавления гемина, а степень фосфорилирования eIF2 α можно оценивать иммуноблотингом с коммерческими антителами против фосфорилированной формы eIF2 α . Известно, что фосфорилирование eIF2 α по Ser51 составляет важный регуляторный механизм ингибирования трансляции, основанный на более прочном взаимодействии eIF2(α P) с фактором eIF2B. Не исключено, что дополнительная регуляция может иметь место и при локализации $\{GTP \cdot eIF2(\alpha P) \cdot Met-tRNA_i^{Met}\}$ в составе 48S PIC. С помощью такой регуляции мог бы контролироваться переход 48S PIC не в полирибосомы, а в стрессовые гранулы, образование которых наблюдаются при многих видах стрессов.

Химические подходы к изучению строения и функционирования эукариотических рибосом во многом дополняют подходы рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии, а в определенных случаях являются основными для изучения молекулярных контактов между компонентами трансляционного аппарата с учетом их природных ковалентных модификаций (например фосфорилирование рpS6), что позволяет еще больше наполнить структурные данные биологическим смыслом и открывает перспективу для управления процессом синтеза белка в прикладных задачах.

В лаборатории структуры и функции рибосом ИХБФМ СО РАН проводятся приоритетные исследования по детальному изучению РНК-РНК и РНК-белковых взаимодействий в рибосомных субчастицах эукариот, в частности человека, и это уникальное направление заслуживает поддержки и развития.

В данной работе проведено детальное изучение взаимодействий между мРНК-аналогами, рибосомными белками uS3, uS7 и eS26, а также факторами инициации eIF2 и eIF3 в составе инициаторных комплексов с разрешением в несколько нуклеотидов и аминокислот. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Основные положения, результаты и выводы диссертационной работы опубликованы в четырех статьях – в международных научных изданиях с высоким импакт фактором, а также докладывались на различных конференциях.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации, включая все основные результаты, научные положения, выводы и заключение.

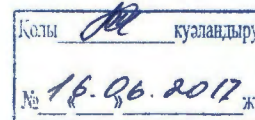
Разнообразие и адекватность методических подходов, большой объем полученных новых и достоверных данных, а также их тщательный анализ и осмысление, позволяют считать, что в целом диссертационная работа «Пептиды рибосомных белков eS26, uS7 и uS3, участвующие в инициации трансляции у млекопитающих» полностью соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор Д. Е. Шарифулин несомненно достоин присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Главный научный сотрудник
лаборатории селекции и биотехнологии
РГП «Институт биологии и биотехно-
логии растений» КН МОН РК
д.б.н., проф.



Искаков

Искаков Булат Кудайбергенович



Почтовый адрес: 050040, г. Алматы, ул. Тимирязева, д. 45, Казахстан
Телефон служебный: +7(727)394-72-67
Телефон мобильный: +7(771)754-03-64
Электронная почта: bulat.iskakov@mail.ru