

ОТЗЫВ

официального оппонента Локтева В.Б. на диссертационную работу
Шарифулина Дмитрия Евгеньевича «Пептиды рибосомных белков eS26, uS7
и uS3, участвующие в инициации трансляции у млекопитающих»,
представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по
специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия»

Актуальность и новизна диссертационной работы связана с тем, что она направлена на исследование одного из важнейших биологических процессов для всех царств живых существ на нашей планете, а именно процессов синтеза белковых молекул на рибосомах клетки, а также на механизмах взаимодействия РНК и полипептидов при биосинтезе полипептидов. Понимание механизмов взаимодействия молекул РНК, рибосомальных белков и факторов инициации на уровне взаимодействия отдельных нуклеотидов и аминокислотных остатков, принципиально важно для создания полной химической модели сложного процесса синтеза белков в прокариотических и эукариотических клетках. Чрезвычайно важную роль в этом процессе играют начальные этапы взаимодействия мРНК и рибосом. Этот ключевой момент запуска синтеза полипептидов в клетке очень важен для понимания возможностей регуляции синтеза белков и поиска потенциальных регуляторов этого процесса. Видимо следует согласиться с простым утверждением, что блокировка взаимодействия, особенно начальных этапов, вирусных мРНК с рибосомами инфицированной клетки фактически означает прекращение вирусной инфекции в клетке и организме. Это только одна из многих возможных причин, почему изучение и понимание механизмов трансляции генетической информации при синтезе разнообразных белковых молекул, формирующих собственно структуру вирусов, микроорганизмов и клеток в многоклеточных организмах имеет огромное прикладное и фундаментальное значение.

К сожалению, приходится признать, что полного понимания процессов инициации трансляции еще не достигнуто. Диссертационная работа направлена на изучение роли пептидов (активных центров) рибосомных белков eS26, uS7 и uS3 в процессах инициации трансляции. Работа направлена на получение новых данных о роли рибосомных белков eS26, uS7 и uS3 в процессах инициации трансляции у млекопитающих, выяснение роли этих полипептидов, особенно uS3, в конформационных перестройках 40S субчастицы рибосомы в участке мРНК-связывающего

канала. Все выше сказанное позволяет рассматривать диссертационную работу как пионерское исследование, обладающее крайне высокой научной значимостью, новизной и большой практической значимостью.

Диссертация Шарифулина Д.Е. написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы, главы с описанием полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка публикаций и списка использованной литературы. Во введении четко определены актуальность проблемы, цели и задачи работы, научная новизна и практическая ценность полученных результатов, а также положения, выносимые автором на защиту. Обзор написан подробно, ясно и логично. Раздел материалы и методы свидетельствует о том, что работа выполнена с использованием современных методов биорганической химии и не оставляет сомнений в достоверности полученных результатов и адекватности их анализа. Результаты собственных исследований и их обсуждение изложены в главе 3 «Роль рибосомных белков в инициации трансляции у млекопитающих (результаты и обсуждение)» разбитой на два подраздела. Результаты представлены четко и последовательно, хорошо иллюстрированы, что убеждает в полноте проведенного исследования и достоверности полученных результатов. Обсуждение результатов диссертационной работы проведено достаточно полно.

В процессе выполнения диссертационной работы автором были сформулированы и решались следующие основные задачи:

- выявление активного центра eS26 и аминокислотных остатков, обеспечивающих взаимодействие с мРНК с 5'-стороны от кодона в Е-участке 80S рибосомы, с применением методологии аффинной модификации рибосом аналогами мРНК с фотоактивируемыми нуклеотидными остатками;
- определение возможных контактов между uS7 и факторами инициации трансляции в 48S PIC;
- идентификации активного центра полипептида uS3, способного в составе 40S субчастиц и 80S рибосом, сшиваться с диальдегидными производными олигонуклеотидов, не фиксированными в мРНК-связывающем центре рибосомы;
- исследование доступности важнейших структурных элементов 40S субчастицы для химических зондов в процессе трансляции.

В рамках настоящей работы на пептидно-нуклеотидном уровне были исследованы тонкие механизмы молекулярных взаимодействий инициации трансляции у высших эукариот. С использованием аффинной модификации

рибосом аналогами мРНК выявлен полипептидный мотив 62-71 а.о. в последовательности eS26. Данный мотив участвует во взаимодействии с мРНК и, по всей вероятности, имеет принципиальное значение в процессах инициации трансляции. С помощью метода сшивок было установлено, что в 48S PIC субъединица α фактора eIF2 взаимодействует с uS7. Это взаимодействие, возможно, обеспечивается конформационными изменениями в eIF2 α при связывании с 40S субчастицей рибосомы. Эти результаты были независимо подтверждены при помощи криоэлектронной микроскопии. С использованием модифицированных производных олигонуклеотидов автору удалось идентифицировать РНК-связывающий пептид в консервативном домене КН полипептида uS3. Вероятно, что этот район обеспечивает взаимодействие рибосом с короткими одноцепочечными РНК вне мРНК-связывающего центра. Диссертантом высказано предположение о возможной функциональной активности этого пептида в составе рибосомы. Обнаружено, что при инициации трансляции участок h16 18S рРНК подвергается конформационным перестройкам. Эти изменения сохраняются в пост-инициаторных 80S комплексах, соответствующих состоянию после связывания аминоктил-тРНК в А-участке перед образованием первой пептидной связи. Также удалось обнаружить универсальные черты канонической для млекопитающих и IRES-зависимой инициации трансляции, характерной для вируса гепатита С.

К важнейшим достижениям диссертационной работы следует отнести:

- установление факта взаимодействия фрагмента 60-71 а.о. eS26 с частью мРНК с 5'-стороны от кодона в Р-участке;
- проведение оценки роли N-концевых фрагментов uS7 и субъединицы α фактора инициации eIF2 во взаимодействии между собой в 48S PIC;
- выявление уникальной способности пептида 55-64 а.о. uS3 по взаимодействию с короткими одноцепочечными РНК в составе рибосомы;
- обнаружение сходства между каноническим и IRES-зависимым механизмами инициации трансляции для геномной РНК вируса гепатита С, связанные с взаимодействием uS7 с eIF2 α .

Рассмотрение работы показывает, что диссертационная работа Шарифулина Дмитрия Евгеньевича является самостоятельным законченным исследованием, посвященным крайне актуальной проблеме установления пептидов рибосомальных белков eS26, uS7 и uS3, взаимодействующих с ключевыми лигандами рибосомы, – мРНК и белковыми факторами в

процессе инициации трансляции в клетках млекопитающих. Представленная работа не лишена определенных недостатков. К ним следует отнести:

- Не совсем согласен с трактовкой автором практической значимости работы. Вне всякого сомнения, диссертант скромно оценивает возможную практическую значимость полученных результатов. На мой взгляд, именно понимание тонких механизмов взаимодействия РНК и рибосомы, выявление принципиально важных регуляторных районов позволит в будущем активно управлять процессами биосинтеза полипептидов в клетке. Это может быть очень важно для решения многих практически важных вопросов биотехнологии, синтетической биологии и медицины.
- Имеются небольшие редакционные замечания. Так, например, раздел «Список литературы» и основной текст диссертационной работы имеют разное форматирование. Стр. 99, таблица 6 – перенос слов в первой строке таблицы. Встречаются некоторые эмоционально окрашенные выражения. Например: «uS3 обладает ярко выраженной способностью взаимодействовать с короткими ...», вывод 3 диссертационной работы. В целом, для текстов такого объема и сложности количество редакционных неточностей совершенно незначительно. Диссертация хорошо читается, написана очень профессионально.

На мой взгляд, для достижения результатов диссертационной работы был использован адекватный набор аналитических и экспериментальных методов исследования химических основ взаимодействия рибосомальных белков и молекул РНК. Это позволило автору успешно решить задачи диссертационной работы. Диссертация представляет законченное исследование, выполненное на современном методическом и теоретическом уровнях. Выводы сформулированы корректно и соответствуют полученным результатам. Основные положения автореферата полноценно отражают материалы диссертационной работы.

Диссертационная работа выполнена в классическом стиле, она изложена на 144 страницах, содержит 46 рисунков и 9 таблиц. Список литературы состоит из 259 ссылок на работы отечественных и зарубежных авторов.

Полученные результаты были успешно апробированы на 6 российских и международных конференциях. По теме диссертации опубликовано 4 статьи в международных журналах.

Заключение

Оценивая работу в целом, можно смело сказать, что проведенные исследования принесли интересные научные результаты, их новизна и достоверность не вызывают сомнений. Фундаментальный характер работы обосновывается новыми данными по особенностям инициации трансляции мРНК в рибосомах млекопитающих, в том числе IRES-зависимой инициации трансляции для геномной РНК вируса гепатита С. Диссертанту удалось детально исследовать возможный механизм химических взаимодействий активных центров рибосомных белков eS26, uS7 и uS3, выявить ключевые аминокислотные последовательности этих полипептидов, предложить новые возможные механизмы взаимодействия обнаруженных активных центров с молекулами РНК. Представляется, что диссертационная работа закладывает фундаментальные основы для понимания механизмов взаимодействия белковых молекул и молекул нуклеиновых кислот в рибосомальных комплексах клеток млекопитающих, а также некоторых РНК-содержащих вирусов реплицирующихся в этих клетках. Понимание химизма процессов, протекающих в рибосомах и обеспечивающих синтез полипептидов в клетках, имеет общебиологическое значение. Открывающие возможности регулирования синтеза полипептидов через воздействие на структурные компоненты рибосом принципиально важно. Например, блокирование синтезов вирусных белков в инфицированных клетках может обеспечить создание нового поколения универсальных противовирусных химиопрепаратов. Основные достижения диссертационной работы формируют новое понимание химизма взаимодействия рибосомальных белков и молекул РНК, что открывает принципиально новые возможности по созданию препаратов регулирующих синтеза белков в клетке. Это может иметь важное значение для развития исследований в области биологии, особенно синтетической биологии, и для современной медицины.

Обобщая вышесказанное, можно сказать, что, несмотря на некоторые замечания, которые носят дискуссионный и редакционный характер, большая научная и практическая важность работы Шарифулина Д.Е. «Пептиды рибосомных белков eS26, uS7 и uS3, участвующие в инициации трансляции у млекопитающих» дает все основания считать, что диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, т.к. в работе решена важная научная задача по определению

механизмов взаимодействия рибосомных белков с факторами инициации и мРНК в комплексах, образующихся в процессе канонической и IRES-зависимой инициации трансляции у млекопитающих. Шарифулин Дмитрий Евгеньевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Зав. отделом
молекулярной вирусологии
флавивирусов и вирусных гепатитов,
ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора,
д.б.н., проф.

В.Б. Локтев

Подпись Локтева В.Б. заверяю:
Ученый секретарь ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"
Роспотребнадзора,
к.б.н., доцент



О.А. Плясунова

Локтев Валерий Борисович
630559, Новосибирская обл., п. Колыцово, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора
Тел (383) 3367453
loktev@vector.nsc.ru

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии
«Вектор» Роспотребнадзора.

Д.б.н., профессор, заведующий отделом молекулярной вирусологии
флавивирусов и вирусных гепатитов.