

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Дмитрия Евгеньевича Шарифулина “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 ТЕМЫ: Диссертационная работа Дмитрия Евгеньевича Шарифулина посвящена изучению структурных особенностей инициации трансляции, осуществляемой рибосомами человека. Трансляция это один из ключевых механизмов реализации генетической программы организма. Более того, регуляция экспрессии генов часто происходит именно на этой стадии. При этом, регуляция трансляции осуществляется в основном на стадии инициации. Хотя структура рибосом исследована сейчас весьма подробно, в данной области остаются существенные пробелы, на заполнение которых и направлена данная диссертация. Дело в том, что с достаточным разрешением исследована структура рибосом бактерий и архей. Для рибосом эукариот, рентгеноструктурный анализ с достаточным разрешением выполнен только для дрожжевых рибосом. Хотя основные функциональные центры рибосомы чрезвычайно консервативны и процесс элонгации трансляции устроен очень сходно у всех организмов, именно процесс инициации трансляции отличается большой специфичностью. Радикально отличаются механизмы инициации трансляции не только бактерий и эукариот, но даже у дрожжей и млекопитающих имеются существенные индивидуальные особенности этого процесса.

В отсутствие данных рентгеноструктурного анализа высокого разрешения о структуре рибосом млекопитающих, необходимо использовать комбинацию структурных методов средней разрешающей способности и альтернативных способов исследования устройства инициаторных комплексов. Применение химических методов, таких, как фотохимическое сшивание, прекрасно зарекомендовало себя в изучении про- и эукариотических рибосом и их функциональных комплексов. В этой связи, весьма актуальным и своевременным является изучение эукариотических рибосом и их функциональных комплексов методами фотоаффинного сшивания. Особенно актуально картирование контактов между компонентами инициаторных комплексов с высокой точностью, что невозможно без применения современных методов анализа белков.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА: В диссертационной работе были использованы самые современные методы, находящиеся в арсенале биорганической химии. Среди них можно встретить тонкие биохимические методики выделения рибосом из клеток высших эукариот и получение функциональных комплексов трансляционного аппарата. Отдельного внимания заслуживает образование комплексов на разных стадиях инициации трансляции и не только на канонических, но и на вирусных мРНК, имеющих участок внутренней посадки рибосом (IRES). В работе используется целый спектр методов сшивания, собственно фотоаффинная модификация, сшивки с помощью формальдегида и сшивки в помощь окисленной до диальдегида рибозы. В работе применяются весьма изящные методы белковой химии.

Полученные в работе результаты являются новыми для биорганической химии. Впервые со столь высоким разрешением были определены места сшивок мРНК с рибосомными белками eS26 и uS3. Также впервые проведено картирование с высоким разрешением контактов между рибосомным белком uS7 и субъединицей фактора инициации трансляции eIF2 α . Работа не ограничивается применением метода фотоаффинного сшивания. Для мониторинга конформационных изменений спирали h16 18S рРНК, образующей своеобразную открывающуюся и закрывающуюся «зашелку» вокруг мРНК с 3'-стороны от декодирующего центра, использовался метод химической модификации РНК. Все полученные результаты являются новыми и органично дополняют известные из научной литературы структурные данные среднего уровня разрешения.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ: Диссертационная работа Шарифулина Д.Е. 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 Шарифулиным Д.Е. 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 биоорганической химии.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ: Диссертация Дмитрия Евгеньевича Шарифулина 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 144 страницах машинописи и содержит 46 рисунков и 9 таблиц. Список цитируемой литературы состоит из 259 источников отечественных и зарубежных авторов.

Обзор литературы посвящен инициации трансляции эукариот. Обращает на себя внимание подробность, последовательность и ясность в изложении материала, видна работа со всеми источниками информации, имеющими отношение к выбранной теме работы. Сначала речь идет об описании функциональной роли каждого из многочисленных инициаторных факторов эукариот. Затем, автор диссертации подробнейшим образом разбирает последовательность стадий и механизм инициации трансляции на канонических мРНК и вирусных мРНК, содержащих IRES элементы. Часть обзора, посвященная IRES элементам, достойна отдельной публикации в виде обзорной статьи в научном журнале. Подробно разобраны особенности строения IRES элементов разных семейств и механизмы инициации трансляции на этих элементах. Завершается обзор литературы подробнейшим разбором структурных особенностей и межмолекулярных контактов в инициаторных комплексах эукариот. Чувствуется большая эрудиция автора, прекрасное владение материалом и скрупулезность 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 “Роль рибосомных белков в инициации трансляции у млекопитающих (результаты и их обсуждение)” автор приводит описание полученных экспериментальных данных. Глава разбита на собственно результаты и обсуждение результатов, что мне кажется важным, поскольку показывает не только способность автора описать полученные им данные, но и обсудить их, поставить их в контекст развития данного направления развития науки в мире. Этот опыт необходим современному ученому и

незаменим при написании научных статей. Именно обсуждение результатов часто является самым трудным для молодых ученых и отрадно видеть, что автор диссертации, Дмитрий Евгеньевич, прекрасно справился с этой задачей. Собственно результаты диссертации описаны в нескольких отдельных главах, несколько обособленных и все же связанных между собой общей методологической основой и общей задачей.

Сначала речь идет об установлении контактов между частью мРНК, расположенной с 5'-стороны от Р-сайта, и рибосомным белком eS26. Используя набор моделей мРНК с фотоаффинной диазириновой меткой, были получены пришивки мРНК к белку eS26. Для картирования участка пришивки был использован гидролиз пришитого к мРНК белка с помощью набора протеаз с различной специфичностью, а также химическим расщепляющим агентом 2-нитро-5-тиоцианобензойной кислотой. Такой анализ позволил картировать место сшивки с точностью до 12 аминокислот. Результаты определения контактирующего пептида не противоречат данным криоэлектронной микроскопии. Следующая часть работы посвящена исследованию контакта между рибосомным белком uS7 и фактором инициации трансляции eIF2. В данном случае был выбран другой метод пришивки, обратимое сшивание с помощью формальдегида. Сначала была подобрана оптимальная концентрация сшивающего агента, затем проведено сшивание компонентов инициаторных комплексов. Идентификацию продуктов сшивки осуществляли с помощью иммуноблоттинга, а картирование места сшивки проводили при помощи масс-спектрометрии. В результате, место контакта было определено с весьма высокой точностью.

Наконец, заключительная часть работы, возможно, одна из наиболее интересных, связана с изучением своеобразной “защелки” вокруг области мРНК с 3'-стороны от декодирующего центра, образованной спиралью h16 18S рРНК и белком uS3. По имеющимся структурным данным, эта “защелка” может пребывать в открытом и закрытом состоянии, а также взаимодействовать с несколькими белками, участвующими в трансляции, такими, как инициаторный фактор eIF3 и РНК хеликаза DHX29, а также с одноцепочечными РНК. В первую очередь было изучено взаимодействие uS3 с одноцепочечными РНК в различных инициаторных комплексах. Интересно, что автор диссертации не ограничился одним методом пришивки, но использовал как фотоаффинное сшивание, так и сшивание с помощью окисленной до диальдегида рибозы. Оказалось, что выход тРНК-независимой пришивки олигорибонуклеотидов к uS3 меняется в нескольких функциональных комплексах рибосомы. Удивительно, что uS3 доступен для сшивки в бинарном 40S инициаторном комплексе, закрыт в 48S комплексе и снова становится доступным в 80S комплексе, скорее относящемся к элонгации

трансляции. На основании данных научной литературы, автор диссертации обоснованно предположил, что защита uS3 может происходить при взаимодействии с “защелкой” компонента инициаторного фактора eIF3j или белка DHX29. В результате проверки наличия этих белков в исследуемых комплексах с помощью иммуоблоттинга, Дмитрий Евгеньевич обнаружил отрицательную корреляцию между связыванием eIF3j и возможностью сшивки uS3 с одноцепочечными РНК. Связывание eIF3j также отрицательно коррелировало с наличием DHX29 в 48S инициаторных комплексах. Для анализа конформационных изменений спирали h16 18S рРНК, находящейся на противоположном от uS3 конце “защелки”, был применен метод химического пробинга. Конформационные изменения были найдены, однако прямой корреляции между этими изменениями и связыванием eIF3j не было. Видимо, спираль h16 18S рРНК “открыта” только в 40S комплексе, а дальше остается конформационно ограниченной, хотя, по-видимому, в силу разных причин.

Работа Дмитрия Евгеньевича Шарифулина “Пептиды рибосомных белков eS26, uS7 и uS3, участвующие в инициации трансляции у млекопитающих” выполнена на высоком 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 4 статьи в международных журналах, причем два из них имеют импакт-фактор выше 5 и 9! Это замечательный результат для молодого ученого, свидетельствующий о международном признании этой работы.

Как и во всякой интересной работе, в работе можно обнаружить некоторые недостатки. Работа содержит небольшое количество опечаток и неточностей, которое не портит общего хорошего впечатления от работы. Только по долгу рецензента я привожу их в отзыве:

Стр. 27. Один из механизмов стимулирования трансляцию специфическими участками мРНК...

Стр. 47. Расщепление eIF4G такими **протезами** приводит к ...

Стр. 63. ... гуанозин 5'-(β, γ)-**метилен**-трифосфата (GMPPNP).

Рисунки 23, 28, 29. В подписи к рисункам имеются ссылки на панели А, Б, ... На рисунке названия панелей скрыты. Возможно, впрочем, это результат каких-то ошибок текстового редактора.

Стр. 95 ... **страт**-кодона...

Стр. 100. ...uS7, выделенного **их** 40S субчастиц.

Стр. 106. Исследование конформационных перестроек в 40S субчастице, происходящие с участием рРНК uS3 и h16 18S рРНК при инициации трансляции

Стр. 108. ...полученном в присутствии анизомина,

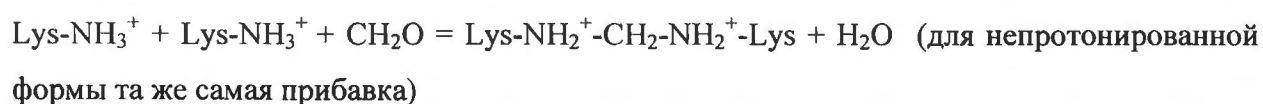
Стр 120. ...что делает возможным взаимодействие с рРНК uS7

Кроме опечаток, которые совершенно незначительны и не имеют отношения к смыслу исследования, у меня возникло несколько вопросов, которые также не имеют принципиального значения, но исследование, на мой взгляд, выиграло бы от их более подробного освещения.

1. Мне показалась интересной не совсем стандартная методика выделения суммарной РНК из комплексов рибосом с использованием медного купороса. Поскольку этот трюк не является общеизвестным, было бы интересно узнать, зачем CuSO_4 используется при выделении РНК.
2. Для сшивок с eS26 использовались аналоги мРНК разной длины, что приводило к различной подвижности продуктов сшивки (Рис. 22). В тексте сказано, что гидролиз РНКазой А не приводил к потере метки в модифицированном белке, поскольку метка ^{32}P в аналогах была непосредственно связана с остатком уридина, который содержал сшивающую группу. После исчерпывающего гидролиза с белком остаются связанными моно- или динуклеотидные фрагменты массой 0.5 или 0.8 кДа соответственно. Насколько я понимаю, на рисунках 23 и 24 картирование участка сшивки проводится именно на образцах, гидролизованных РНКазой, поскольку разницы в подвижности продуктов сшивки мРНК разной длины на рисунках нет. Хотелось бы, чтобы в подписях к рисункам было определенно сказано о том, была ли проведена предобработка РНКазой или нет.
3. На панели "А" рисунка 27 приведен анализ инициаторных комплексов с помощью тоупринта. Обычно при тоупринтинге показывают и полосу, соответствующую полноразмерному продукту обратной транскрипции, по крайней мере, от нас это требовали при публикации нескольких последних работ. Нисколько не сомневаясь в высоком качестве тоупринта, которое очевидно из приведенного рисунка, думаю, что рисунок удовлетворил бы и самых вездливых читателей, если бы верх геля был бы также включен в панель "А".
4. При идентификации сшитых пептидов белков uS7 и eIF2 α использовалась масс-спектрометрия. В результате были выявлены два пика, с массами 2400.06 и 2873.37 Да, которые отсутствовали в спектрах сшитых контрольных 40S субчастиц и которые исчезали в результате разрушения связи между сшитыми пептидами; Было бы интересно узнать больше о контрольном образце: использовался ли uS7 или проводился анализ того

участка геля, которое по подвижности соответствовало сшивке? Появлялись ли массы, соответствующие индивидуальным взаимодействующим пептидам после обращения сшивки?

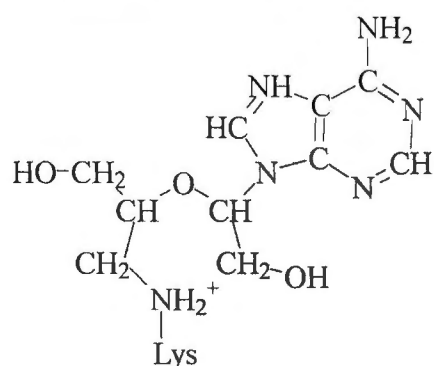
5. Для того, чтобы отнести пики к сшитым пептидам гр uS7 и eIF2 α , их массы сравнивали с массами, полученными при сложении масс всех возможных триптических пептидов белков eIF2 α и гр uS7, с добавлением массы метиленовой группы (14 Да). Я не уверен в том, что добавленная масса должна быть равна именно 14 Да. При сшивке двух аминогрупп добавляется метиленовая группа, CH₂, это верно. Однако должны исчезнуть два атома водорода при аминогруппах, что дает меньшую ожидаемую прибавку к массе (12 Да):



Не вполне понятно также, будет ли трипсин расщеплять белки после сшитых лизинов.

6. Вопрос к масс-спектрометрическому анализу фосфорилированной формы белка uS3. В работе было показано, что менее подвижная полоса (б) содержит фосфорилированные пептиды uS3. Не сказано, отсутствовали ли фосфорилированные пептиды uS3 в более подвижной полосе (а) и присутствовали ли там вместо них соответствующие нефосфорилированные пептиды?

7. У меня не сходится значение ожидаемой массы пришивки окисленной рибозы аденозина к пептиду uS3 55-TQNVLGEKGR-64 после восстановления цианоборогидридом. Возможно, ошибка в моих расчетах. Предполагаемый продукт, на мой взгляд, должен выглядеть так:



Прибавка к массе пептида C₁₀N₅O₃H₁₃ (с учетом потери одного водорода пептидом) – 251 Да. Масса пептида, согласно расчету, 1101 Да, итого 1352 Да (если не восстанавливается второй альдегид - 1350). Все равно, 1335 Да не получается.

Отмеченные недостатки не имеют, конечно, принципиального характера и не отражаются на общем хорошем впечатлении от работы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ: Все вышеизложенное позволяет констатировать, что диссертация Дмитрия Евгеньевича Шарифулина “Пептиды рибосомных белков eS26, uS7 и uS3, участвующие в инициации трансляции у млекопитающих”, представленная на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия, является законченным самостоятельным научным исследованием, в котором решена актуальная задача по определению механизма инициации трансляции у млекопитающих. Автором получены ценные экспериментальные результаты и сделаны глубоко обоснованные обобщения.

Таким образом, по актуальности темы, объему, новизне полученных результатов и их научной и практической значимости представленная диссертация соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842; а ее автор, Шарифулин Д.Е., без сомнения, заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

д.х.н., профессор кафедры ХПС
химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова
Сергиев Петр Владимирович



Декан химического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова
Академик РАН, профессор, д.х.н. Лунин В.В.

Сергиев Петр Владимирович, д.х.н. (02.00.10 – биоорганическая химия), МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40. Тел.: +7 495 9395418, e-mail: petya@genebee.msu.ru