

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ИНСТИТУТ
ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ

СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИХБФМ СО РАН)

Просп. Ак. Лаврентьева, 8, г. Новосибирск, 630090
тел. (383) 363-51-50
факс (383) 363-51-53
E-mail: niboch@niboch.nsc.ru
http://www.niboch.nsc.ru

УТВЕРЖДАЮ

директор

ИХБФМ СО РАН

акад. В.В. Власов



«24» ноября 2014

24.11.2014 № 15309-2115-32

На № _____

О Т З Ы В

ведущей организации – ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН - на диссертационную работу **НЕСТЕРЧУКА Михаила Васильевича**
«Выключение синтеза белка в бактериальной клетке с помощью олигоглутамилирования
рибосомного белка S6»,

представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности
02.00.10 – биорганическая химия

Биосинтез белка на рибосомах – трансляция является одним из самых энергозатратных процессов в живой клетке. Это подразумевает, что клетка должна иметь хорошо отлаженный механизм регуляции трансляции, который был бы в состоянии управлять активностью рибосом в зависимости от её потребности в тех или иных белках. Бактерии используют целый ряд механизмов для обратимого подавления биосинтеза белка в неблагоприятных условиях, в том числе и при воздействии антибиотиков. Изучение этих механизмов, помимо чисто научного интереса, имеет также и терапевтическое значение, поскольку их понимание имеет принципиальное значение для разработки новых методов борьбы с бактериальными штаммами, резистентными к действию антибиотиков.

В настоящее время существует точка зрения, что трансляционная активность бактериальной рибосомы может регулироваться посредством модификации рибосомных белков клеточными ферментами. Известно, что самыми распространёнными посттрансляционными модификациями рибосомных белков являются отщепление N-концевого метионина, метилирование и ацетилирование. Реже встречаются такие модификации, как метилтиолирование, гидроксиглирование и частичный протеолиз. Самой необычной посттрансляционной модификацией является олигоглутамилирование - добавление дополнительных остатков глутаминовой кислоты на C-конец рибосомного белка S6 *Escherichia coli*, осуществляемое ферментом RimK.

Диссертационная работа Нестерчука М.В. направлена на установление функциональной роли олигоглутамилирования рибосомного белка S6 *E.coli* в жизнедеятельности клеток бактерий. Исследования в данной области относятся к приоритетному направлению развития научно-технологического комплекса России «Живые системы», а также к критическим технологиям «Геномные и постгеномные технологии создания лекарственных препаратов», поэтому актуальность представленной работы не вызывает сомнений.

Работа изложена на 108 страницах, содержит 52 рисунка, 2 таблицы и включает 105 цитированных работ. Основные результаты работы представлены и апробированы на четырёх международных конференциях и опубликованы в виде трёх статей в рецензируемых научных журналах и главы в книге. Диссертация построена традиционным способом и состоит из введения, обзора литературы, изложения результатов и их обсуждения, главы с описанием материалов и использованных методов исследования, выводов и списка цитируемой литературы.

Во введении сформулирована фундаментальная проблема, с которой связана обсуждаемая диссертационная работа, обоснована актуальность исследований и сформулированы цель и задачи работы.

В обзоре литературы собрана практически вся имеющаяся на сегодняшний день информация о посттрансляционных модификациях, свойственных для рибосомных белков *E.coli*, дана характеристика этих модификаций и описаны их известные функциональные проявления. Литературный обзор содержит систематизированные диссертантом данные о ферментах, осуществляющих модификацию рибосомных белков, и подробное описание изученных к настоящему времени механизмов химических реакций, катализируемых этими ферментами. Из обзора становится понятно, насколько большое значение в жизнедеятельности бактериальной клетки имеют посттрансляционные модификации рибосомных белков. Обзор литературы изложен в классическом академическом стиле и хорошо иллюстрирован, что значительно облегчает восприятие излагаемого материала.

В главе II приведены результаты собственных исследований автора и их обсуждение. На начальном этапе своего исследования диссертант использовал штамм *E.coli*, в котором был удалён ген, кодирующий фермент RimK, и в котором, следовательно, отсутствовало олигоглутамилирование белка S6. На основе этого штамма диссертант создал модельные штаммы *E.coli*, в которых, вместо гена, кодирующего рибосомный белок S6, были вставлены кассеты с геном устойчивости к хлорамфениколу и геном, кодирующим либо немодифицированный рибосомный белок S6, либо этот же белок, дополненный четырьмя остатками глутамина по С-концу. Далее с помощью полученных штаммов соискатель исследовал зависимость модификации белка S6 от стадии роста бактериальной культуры. Анализируя наличие модификации S6 на разных стадиях роста культуры клеток, он установил, что модификация этого белка имеет место только в стационарной фазе роста. В своих последующих опытах Нестерчук М.В. определял субстратную специфичность фермента RimK, используя в качестве субстратов 30S субчастицы, 70S рибосомы или 100S рибосомные частицы, а также суммарный рибосомный белок, полученный из клеток, находящихся в стационарной или логарифмической фазе роста. Диссертанту удалось показать, что свободный белок S6, в отличие от других субстратов, не является мишенью для фермента, осуществляющего олигоглутамилирование. Полученные результаты навели его на мысль, что модификация

рибосомного белка S6 может быть связана с регуляцией трансляционной активности рибосом. Для проверки этого предположения диссертант провёл сравнительный протеомный анализ суммарного белка из клеток дикого типа и штамма с делецией гена, кодирующего фермент RimK, в стационарной и логарифмической фазах роста. Для протеомного анализа им использован двумерный дифференцированный гель-электрофорез в сочетании с пульс-мечением вновь синтезированных белков с помощью остатков гомопротаргилглицина с последующим их мечением флуоресцентными красителями. Результаты протеомного анализа, дополненные результатами количественного анализа биосинтеза белка в указанных штаммах, ясно показали, что модификация белка S6 остатками глутаминовой кислоты приводит к радикальному снижению трансляционной активности клетки.

Наконец, финальная часть исследований была посвящена выявлению связи между модификацией белка S6 и переходом клетки в неактивное состояние в условиях дефицита ресурсов. С этой задачей соискатель также успешно справился. Используя метод проточной цитометрии, он продемонстрировал, что в стационарной фазе роста при недостатке питательных ресурсов в клетках происходит олигоглутамилирование рибосомного белка S6, сопровождающееся общим снижением белоксинтезирующей активности клеток и их переходом в «спящее» состояние. Наоборот, в логарифмической фазе роста при возвращении благоприятных условий в клетках происходит синтез новых рибосом с немодифицированным белком S6, которые замещают неактивные рибосомы и восстанавливают уровень трансляционной активности в клетках.

Таким образом, в результате проведённых исследований Нестерчук М.В. установил, что (1) фермент RimK, ответственный за олигоглутамилирование, действует на белок S6 только в составе собранной рибосомы, приводя к его необратимой модификации; (2) олигоглутамилирование белка S6 происходит только в стационарной фазе роста клеток, что сопровождается падением их трансляционной активности; (3) при возникновении условий для логарифмической фазы роста в клетке синтезируются рибосомы с немодифицированным белком S6, и при увеличении их доли в общем пуле рибосом уровень трансляционной активности клетки возрастает. Как достоинство работы следует отметить предложенный диссертантом на основании полученных данных механизм ингибирования трансляции олигоглутамилированием рибосомного белка S6, который было бы интересно проверить с использованием генетических конструкций, позволяющих получать штаммы *E.coli* продуцирующие белок S6, с положительно заряженными аминокислотными остатками на C-конце.

Глава III содержит исчерпывающее описание методов и подходов, использованных автором в своих исследованиях. Из представленного материала видно, что работа выполнена на высоком экспериментальном уровне с применением как классических методов исследования, принятых в молекулярной биологии (например, клонирование ДНК, мутагенез *in vitro*, иммуноблоттинг и др.), так и самых современных методов, требующих высокой квалификации исследователя (проточная цитометрия, двумерный дифференцированный электрофорез белков в полиакриламидном геле и др.). Подробное описание методов указывает на то, что соискатель в совершенстве владеет приведёнными методиками и может уверенно использовать их в своей работе.

В целом, диссертационная работа Нестерчука М. В. представляет собой систематическое законченное исследование, выполненное автором в коллективе специалистов в области биоорганической химии и молекулярной биологии. Материал диссертации изложен логично и ясно. Используемые в работе экспериментальные подходы приняты в практике подобных исследований и обоснованы. Результаты выполненных опытов достоверны и сформулированные выводы вытекают из экспериментальных данных. В рамках общих требований, предъявляемых к написанию диссертаций, можно отметить, что материал диссертации изложен научным языком, хорошо оформлен и подробно иллюстрирован.

По написанию и оформлению диссертационной работы имеется ряд замечаний. Так, на стр. 48 соискатель отмечает, что он «выделяет три направления» в задаче своего исследования, однако при этом о самой задаче он почему-то умалчивает. В тексте диссертации встречаются жаргонные фразы и англицизмы, например: «штамм с нокаутом гена» (стр. 47), «S30 клеточный экстракт» (стр. 53), «гель проявляли с помощью автордиографии» (там же), «белки окрашивали флуоресцентной краской Cy5» (стр. 55), «встраивание гомопротаргилглицина останавливали скручиванием клеток» (стр. 96) и др. Текст работы содержит ряд стилистических ошибок, например: «рибосомы из стационарной фазы» (стр. 54), «к решению проблемы экономии ресурсов клетка подходит с нескольких сторон» (стр. 60), «отличить спящие клетки от активно синтезирующих белок» (стр. 70), «окрашивание мембраны проводили с помощью “ECL+ kit” (GE Healthcare)» (стр. 93), «активно метаболизирующие и делящиеся клетки становятся мишенью для многочисленных антибиотиков» (стр. 79), и т.п. Кроме того, в ряде мест диссертации отсутствуют необходимые ссылки, например, во втором и третьем параграфах на стр. 61. Из текста на стр. 71 непонятно, какой тип индуктора использовали при инкубации клеток, и какой процесс данный индуктор запускал.

Указанные замечания не являются принципиальными и не снижают ценности обсуждаемой диссертационной работы, где впервые установлена роль посттрансляционной модификации белка S6 *E.coli* в регуляции трансляционной активности бактериальных клеток.

Основные результаты диссертационной работы М.В. Нестерчука опубликованы в виде статей в отечественной и зарубежной печати. Статьи и автореферат достаточно полно отражают сущность диссертационной работы. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации. В целом диссертационная работа Нестерчука М.В. является завершенным научным исследованием, результаты и выводы которого имеют принципиальное значение для более глубокого понимания молекулярных механизмов биосинтеза белка у бактерий. Результаты и выводы диссертации, а также представленные в ней методические разработки, могут быть использованы в Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки: Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институте биохимии им А.Р. Баха РАН, Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институте белка РАН, Институте цитологии и генетики СО РАН, Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и др.

Таким образом, диссертационная работа Нестерчука М.В. вносит весомый вклад в биоорганическую химию, существенно расширяя наши знания о регуляторной роли посттрансляционных модификаций рибосомных белков в процессе трансляции у бактерий, и механизмах приспособления бактериальных клеток к неблагоприятным условиям роста. Представленная работа полностью соответствует предъявляемым к кандидатским диссертациям

требованиям, изложенным в п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года. В частности, в ней содержится решение задачи, направленной на установление функциональной роли посттрансляционной модификации – олигоглутамилирования бактериального рибосомного белка S6 в регуляции трансляции, и получены важные результаты, имеющие значение для развития биоорганической химии. Автор диссертационной работы, Нестерчук Михаил Васильевич, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Отзыв на диссертационную работу Нестерчука Михаила Васильевича заслушан и утверждён на семинаре Лаборатории структуры и функции рибосом Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН 21 ноября 2014 г., протокол № 8.

Старший научный сотрудник
Лаборатории структуры и функции рибосом
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института химической биологии и
фундаментальной медицины
Сибирского отделения РАН
к.х.н., доцент

А.А. Малыгин

Зав. Лабораторией структуры и функции рибосом
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института химической биологии и
фундаментальной медицины
Сибирского отделения РАН
д.х.н., профессор

Г.Г. Карпова

Подписи А.А. Малыгина и Г.Г. Карповой удостоверяю

Учёный секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института химической биологии и
фундаментальной медицины
Сибирского отделения РАН
к.б.н.,



М.Р. Кабилов