

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Нестерчука М.В. «Выключение синтеза белка в бактериальной клетке с помощью олигоглутамилирования рибосомного белка S6», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

Диссертационная работа Нестерчука Михаила Васильевича посвящена установлению функциональной роли посттрансляционной модификации рибосомного белка S6 *Escherichia coli* и является частью важного направления в современной молекулярной биологии и биоорганической химии по изучению принципов регуляции трансляции и механизмах приспособления бактериальной клетки к неблагоприятным условиям.

Актуальность темы диссертации.

В 2009 году Нобелевская премия по химии была присуждена Аде Йонат, Венки Рамакришнан и Томасу Стайц «за исследования строения и работы рибосом», в частности, за получение кристаллов рибосом и их рентгеноструктурный анализ. Однако многие механизмы регуляции трансляции так и остались невыясненными. Это, в первую очередь, касается ферментативных модификаций компонентов рибосомы - метилирования, псевдоуридинилирования, дигидроуридинилирования рРНК, а также метилирования и ацетилирования рибосомных белков. Многие из этих модификаций, возможно, выполняют регуляторную роль. Изучение механизмов регуляции трансляции необходимо, поскольку именно эти механизмы лежат в основе способности бактериальной клетки, в том числе и патогенной, приспособления к неблагоприятным условиям окружающей среды. Расшифровка этих механизмов позволит понять процессы формирования резистентности бактериальных патогенов к используемым антибиотикам, и, в перспективе, синтезировать новые эффективные и безопасные для человека и животных антибактериальные препараты. Таким образом, тема диссертационной работы является, безусловно, актуальной.

1. Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы.

На основании проведенной исследовательской работы автором сделано шесть выводов, которые основаны на обширном экспериментальном материале и полностью отражают результаты работы. Необходимо отметить, что работа выполнена на высоком профессиональном уровне. Достоверность результатов и выводов диссертационной работы Нестерчука М.В. не вызывает сомнений.

Автор изучил одну из самых необычных посттрансляционных модификаций рибосомных белков *Escherichia coli* - к С-концу белка S6 добавляются дополнительные остатки глутаминовой кислоты. Это является первым установленным случаем такого последовательного наращивания полипептидной цепи. В связи с этим, целью работы стало установление функциональной роли этой модификации рибосомального белка.

Для достижения этой цели необходимо решение ключевых задач: установить, в какой момент происходит модификация, что является субстратом фермента ее осуществляющего и, наконец, понять функциональную роль этой модификации.

В ходе выполнения экспериментальной части работы автором была установлена зависимость модификации белка S6 от стадии роста бактериальной культуры, а также показано, что олигоглутамилирование рибосомного белка S6 необратимо. Создана система *in vitro* модификации рибосомного белка S6. Автор впервые продемонстрировал, что белок S6 олигоглутамилируется только в составе уже собранной рибосомы, а свободный белок S6 не подвергается модификации. Наконец, обнаружено, что модификация белка S6 способствует переходу бактериальной клетки в «спящее» состояние.

Все эксперименты проведены автором на высоком методическом уровне, что явилось залогом успеха диссертационной работы.

2. Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики.

Говоря о фундаментальных аспектах работы, необходимо отметить, что в работе было установлено - фермент RimK модифицирует белок S6 только в составе собранной рибосомы и данная модификация приводит к подавлению трансляции. Автором впервые показана регуляция процесса трансляции в бактериальной клетке с помощью модификации компонента рибосомы. Кроме новых фактов, весомых для развития фундаментальных научных знаний, Нестерчуком М.В. получены результаты, имеющие большой практический потенциал. Известно, что бактерии используют целый ряд механизмов для обратимого подавления трансляции в неблагоприятных условиях. Полученные в ходе выполнения диссертационной работы новые знания о таких механизмах позволят, в перспективе, создавать высокоэффективные антибактериальные средства направленного действия.

3. Содержание диссертации.

Объем диссертационной работы Нестерчука М.В. составляет 108 страниц и состоит из введения, обзора литературы, глав «Обсуждение результатов», «Материалы и методы»

и выводов. Список литературы включает 105 источников, из которых работы последних 5 лет составляют 20% от общего количества, также в работе содержится 52 рисунка и 5 таблиц.

Литературный обзор полностью раскрывает современное состояние исследуемой проблемы. Обзор литературы хорошо структурирован и описывает особенности известных посттрансляционных модификаций рибосомных белков *Escherichia coli*.

Материалы и методы изложены подробно, их описание позволит без затруднений воспроизвести используемые в работе методики.

Описание результатов выполнено чрезвычайно подробно и наглядно оформлено.

Выводы диссертации и положения, выносимые на защиту, базируются на результатах работы, обоснованы и достоверны.

Имеются существенные замечания по оформлению диссертационной работы, общая небрежность в написании рукописи, а именно: структура диссертационной работы выстроена не классическим способом, например, отсутствуют отдельно сформулированные актуальность проблемы, цели и задачи исследования; глава «Материалы и методы» расположена после заключения, что, в совокупности, затрудняет общее восприятие исследования. Язык изложения полученных результатов несколько упрощенный. В главе Результаты и обсуждение вместе с собственно результатами имеется описание различных механизмов, происходящих в клетке (приспособление к голоданию), что было бы логичнее перенести в Обзор литературы. Кроме того, вначале хотелось бы увидеть все полученные результаты, а уже потом их обсуждение. При проведении экспериментов не были указаны статистические методы анализа, которыми пользовался автор при определении достоверности полученных результатов (биологические и технические повторности, ошибка опыта, доверительный интервал и т.д.), не указан статистический пакет программ, использованных для расчетов.

Также в тексте диссертации имеются опечатки и синтаксические ошибки: стр. 12 «L31 – малоизученный компонент бактериальной рибосомы», стр. 57 «рис 2.9. Двумерный электрофорез вновь синтезированного белка из клеток дикого типа и $\Delta rimK$ в различных фазах роста», стр. 60 «Когда количество питательных веществ становится ограниченным, бактериальная клетка переходит в, так называемую, стационарную фазу, состояние, которое характеризуется рядом морфологических и физиологических особенностей».

К сожалению, автором не было проведено транскрипционное профилирование для стационарной и логарифмической фаз роста бактерий для подтверждения полученных, с использованием других методов, результатов по модификации рибосомного белка S6.

Тем не менее, следует отметить, что перечисленные выше замечания не снижают общей положительной оценки работы.

4. Опубликование результатов диссертации в научной печати.

Результаты диссертационной работы Нестерчука М.В. в достаточной степени представлены в печатных работах – опубликовано 3 статьи в российских центральных научных журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ и в зарубежных журналах, а также глава в книге. Материалы диссертации представлялись Нестерчуком М.В. на отечественных и международных конференциях.

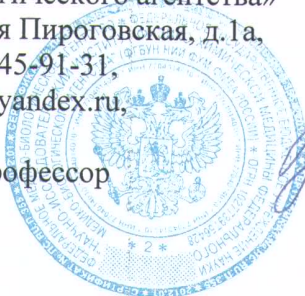
5. Содержание автореферата.

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации. Автореферат хорошо иллюстрирован, логично оформлен и дает полное представление о проделанной работе и ее отдельных этапах.

6. Заключение.

Диссертационная работа Нестерчука М.В. «Выключение синтеза белка в бактериальной клетке с помощью олигоглутамилирования рибосомного белка S6» имеет важное значение для развития фундаментальных и прикладных аспектов биоорганической химии и отвечает всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата химических наук, а ее автор Нестерчук Михаил Васильевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Заместитель директора
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Научно-исследовательский
институт физико-химической медицины
Федерального медико-биологического агентства»
(119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д.1а,
www.niifhm.ru, тел. +7(499)245-91-31,
e-mail оппонента vgovorun@yandex.ru,
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН, профессор



Говорун Вадим Маркович

20 ноября 2014 г.