

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Нестерчука Михаила Васильевича **«Выключение синтеза белка в бактериальной клетке с помощью олигоглутамилирования рибосомного белка S6»**, представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Изучение рибосом и их биогенеза давно находится в центре внимания ученых всего мира, и этот интерес не ослабевает, так как многие загадки строения и функций рибосомы еще не нашли своего решения. Биогенез рибосом требует значительных энергетических затрат и подвержен строгой регуляции у всех организмов. Для экономии клеточных ресурсов в процессе эволюции появились разнообразные механизмы, позволяющие регулировать как количество рибосом в клетке (подавление или включение синтеза рибосомных компонентов), так и их активность в зависимости от внешних сигналов – наличия питательных веществ, различных стрессовых факторов. Это стратегия выживаемости бактерий. Молекулярная основа многих из этих механизмов не выяснена. Важность исследований бактериальных рибосом и их регуляции обусловлена не только фундаментальным интересом, но и тем, что именно рибосома и процесс трансляции являются мишенями для многих антибиотиков, а существование резистентных микробных форм делает поиск новых антибактериальных агентов актуальным и практически значимым.

Диссертационная работа Михаила Нестерчука посвящена поиску решения одной из неразрешенных загадок бактериальной рибосомы – выяснению биологической роли уникальной пост-трансляционной модификации рибосомного белка S6. Было известно, что высоко консервативный фермент RimK катализирует добавление нескольких остатков глутаминовой кислоты к альфа-карбоксильной группе С-концевого Glu-остатка белка S6, однако биологический смысл этого оставался непонятным. Автору удалось не только выяснить, на каком этапе жизненного цикла происходит эта модификация, но и показать ее роль в снижении активности рибосом в неблагоприятных условиях. Это совершенно новый результат, ни в одном другом случае пост-трансляционной модификации рибосомных белков роль модификации в контроле активности рибосом описана не была.

Диссертация построена по общепринятой форме, изложена на 108 стр., включает 105 ссылок на литературные источники, прекрасно оформлена и иллюстрирована. Стиль изложения четкий, ясный. Перед читателем высокопрофессиональный научный текст, что является несомненным достоинством работы. На это сразу обращаешь внимание при чтении литературного обзора, посвященного описанию пост-трансляционных модификаций рибосомных белков *E. coli*. Этот обзор можно считать образцовым по полноте представленных данных и наглядности таблиц и иллюстраций. Ценность обзора состоит и в том, что он открывает перспективы для дальнейших поисков и исследований, так как для многих известных модификаций р-белков до сих пор не установлен модифицирующий фермент (для 6 случаев из 14!), а также неизвестна биологическая роль модификации. Обзор опубликован, имеет цитируемость (в частности, в базе данных EсоСус). Замечания по обзору есть, но несущественные – это отсутствие ссылок на источник изображения в ряде рисунков, где показано расположение р-белка в структуре рибосом и положение модифицированных аминокислотных остатков. Кроме того, для описания кислотности белка S6, по-видимому, использовались разные источники (надо было бы ссылки привести). Так, на стр. 45 рI белка 4,8, а на стр. 47 уже другие цифры – для немодифицированной формы 5,26, а модифицированной – 4,93. Но в целом обзор хорош, очень хорош.

Главу Обсуждение результатов следовало бы назвать Результаты и обсуждение (ведь отдельной главы Результаты нет), как принято в статьях, но это не так важно. Автор четко формулирует задачи исследования – (1) установить, на каком этапе роста происходит модификация и как она зависит от внешних факторов; (2) установить субстрат для модифицирующего фермента RimK – свободный ли это белок, или же S6 узнается в составе 30S субчастицы или 70S рибосомы; (3) получить ответ на важнейший вопрос – на что влияет модификация, для каких целей клетка использует столь необычную систему «навешивания» дополнительных кислых остатков на С-конец одного из многих рибосомных белков. Успех диссертанта состоит в том, что эти поставленные задачи были решены, и на основании полученных результатов были сделаны строгие и адекватные выводы.

Для выполнения поставленных задач автор использовал разнообразные подходы. Это методы генной инженерии и молекулярной генетики для конструирования мутантных штаммов, иммунохимические подходы для анализа количеств модифицированной и немодифицированной форм S6, методы биохимии *in vitro* для определения субстратной специфичности RimK (выделение рибосом, рекомбинантных белков), протеомный анализ (электрофоретическое разделение тотальных белков и анализ различий в экспрессии с применением флуоресцентного мечения белков). Следует также отметить элегантные эксперименты с применением флуоресцентного белка-таймера и проточной цитометрии. Одно перечисление задействованных современных методов исследования говорит о том, что автор – сложившийся исследователь, настоящий профессионал, владеющий богатым арсеналом подходов для решения современных задач биологии живой клетки.

Из всей суммы данных, полученных в работе, прежде всего надо отметить следующие пионерские результаты.

- Впервые строго доказано, что модификация белка S6 происходит не в логарифмической, а в стационарной фазе роста клеток.
- Доказано, что в клетке отсутствует ферментативная активность, снимающая с С-конца белка S6 дополнительные остатки глутаминовой кислоты.
- Установлена мишень для модифицирующего фермента RimK, это белок S6 в составе собранной рибосомы.
- Установлена связь между трансляционной активностью рибосом и модификацией S6. Предложена вполне обоснованная гипотеза о том, что олигоглутамилирование белка S6 является одним из механизмов снижения активности рибосом при неблагоприятных условиях. Это открывает перспективы для дальнейших исследований. Стационарная фаза клеточных культур исследована в этой работе, но стрессовые для клетки условия разнообразны. Изменяется ли уровень модификации S6 при индукции голодания в логарифмической фазе (в условиях индукции строгого ответа) или при других видах стресса (напр., при окислительном стрессе)? Это очень ценно, когда работа открывает новые горизонты, способна генерировать новые вопросы.
- Показано существование связи между модификацией S6 и способностью клеток *E. coli* к образованию «персистеров» (спящих клеток) в популяции. Изучение условий образования субпопуляции бактериальных клеток, устойчивых к воздействию антибиотиков, – очень горячее и даже модное направление сегодня.

Работа не лишена недостатков (безупречных диссертаций в природе не существует), к изложению материала есть ряд вопросов. В начале главы Обсуждение результатов автор дает описание использованных в работе штаммов (почему-то это попало в раздел Введение, стр. 48, хотя это уже описание результатов). Автор создал оригинальный штамм, в котором дополнительные остатки глутаминовой кислоты закодированы в самом хромосомном гене *rpsF* (S6), рядом с которым был клонирован

маркер устойчивости к хлорамфениколу. Был создан также контрольный штамм, который нес маркер, но ген *rpsF* оставался диким. Эти два новых штамма сыграли свою важную роль для строгого доказательства отсутствия в клетке ферментативной активности, способной удалять дополнительные остатки глутаминовой кислоты с С-конца S6. Очень хорошие полезные новые рекомбинантные штаммы. Но где их характеристики? Почему они не были в дальнейшем использованы в работе, например, для выяснения роли дополнительных Glu-остатков в белке S6 в снижении активности рибосом? К этой части работы есть и другие вопросы. На рисунке 2.1 ген *rpsF* представлен без его природных фланков, как будто это моноцистронный оперон. На самом деле *rpsF* – это первый ген в опероне, в котором 4 гена (*rpsF-priB-rpsR-rplL*), 3 из которых кодируют рибосомные белки S6, S18 (*rpsR*) и L9 (*rplL*), а четвертый (*priB*, сосед *rpsF* в опероне) – компонент праймосомы белок N, необходимый для рестарта репликации. Теоретически вставка в оперон кассеты, несущей устойчивость к хлорамфениколу, вполне может нарушить транскрипционно-трансляционное сопряжение, снизить выход продуктов удаленных от промотора генов с печальными для клетки последствиями – как минимум, привести к дефекту роста. Эти соображения должны быть приведены в работе как комментарий к созданным штаммам, а их нет, как будто никаких проблем не могло возникнуть. То, что штаммы жизнеспособны, это ясно, ведь именно с их помощью доказано отсутствие демодификации S6 в клетке. Однако, их неиспользование в дальнейшей работе, в частности, для изучения роли модификации в снижении трансляционной активности рибосом, наводит на мысль, что они для этой цели не подходят, так как проблема в маркере, а не в модификации. Автор должен был бы дать объяснение. Второе замечание касается описания механизмов реагирования бактериальной клетки на стресс (стр. 61). Естественно, автор упомянул так называемый строгий ответ (stringent response) как основной механизм клеточного ответа на аминокислотное голодание. Но где ссылки на источники этой информации? Безусловно, существует море оригинальных статей, но в данном контексте достаточно было процитировать несколько обзоров на эту тему и несколько последних статей, касающихся конкретной информации – кто показал, что ppGpp промотирует экспрессию гена гибернационного фактора Rmf, кто идентифицировал положение ppGpp в структуре РНК-полимеразы. Кстати, это помогло бы избежать ошибки, ведь ppGpp связывается не с β -субъединицей, как утверждает автор, а между ω и β' [Zuo et al. 2013; Ross et al. 2013]. Других существенных замечаний нет.

Несмотря на отмеченные выше недостатки, в целом работа оставляет прекрасное впечатление. Это высокопрофессиональный научный труд, тщательно оформленный и четко изложенный. Работа выполнена на актуальную тему, а новизна представленных результатов бесспорна. Изучение механизмов регуляции – очень увлекательный, но и очень трудоемкий и «время затратный» процесс. Он требует не только владения разнообразными техническими приемами и методами экспериментальной работы, но и глубоких знаний литературных источников. Михаил Нестерчук в этой диссертации продемонстрировал и профессиональное владение методами и глубокие теоретические знания. Работа расширила современные представления о роли отдельных рибосомных компонентов в регуляции биосинтеза белка в бактериальной клетке.

Результаты диссертации и предложенные в ней методы и подходы отражены в публикациях, реферат написан четко и ясно, его содержание полностью соответствует диссертации в целом. Выводы сформулированы кратко и корректно, они полностью адекватны представленным экспериментальным данным. Результаты работы, несомненно, найдут применение и дальнейшее развитие в различных учреждениях РАН биологического профиля: Институте Белка, ИМБ, ИБХ, ИМГ,

ИБГ, Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, в
НИИ ФХБ МГУ.

Высокий экспериментальный и теоретический уровень диссертационной работы, разнообразие используемых подходов и важность полученных результатов, открывающих новые перспективы исследования роли пост-трансляционных модификаций белков в трансляционной активности рибосом и ее регуляции, позволяет с полным основанием заключить, что диссертация соответствует требованиям ВАК РФ о порядке присуждения ученых степеней (пункт 9), а ее автор Михаил Васильевич Нестерчук безусловно заслуживает ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 –биоорганическая химия.

Старший научный сотрудник лаборатории структуры и функции генов человека ИБХ РАН,

к.х.н. Бони Ирина Венедиктовна



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова»

Почтовый адрес: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10

эл. почта: irina_boni@ibch.ru

тел. 8(495)330 63 29

21 ноября 2014 г

ПОДПИСЬ ЗАВЕРЯЮ
УЧЕНЫЙ СЕКРЕТАРЬ
ИБХ РАН
Д.Ф.М.Н. В.А. Олейников

