



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

119991, ГСП,-1, г.Москва В-334, ул. Вавилова, 32. Для телеграмм: Москва В-334, ИМБ РАН.; л/с 06319001290 в ОФК по ЮЗАО г.Москвы, т.сч. 40503810300001009007, в Отделении №1 Московского ГТУ Банка России г..Москва 705, БИК 044583001, ИНН. БАНКА 7724189956 ОКПО – 02699501, ОКОНХ - 95110 тел. 135-23-11. 135-11-60; факс 135-14-05

УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора ИМБ РАН, д.б.н. проф.

В.Л. Карпов

« 17 » ноября 2015 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии
наук

о диссертационной работе Митрошина Ивана Владимировича
«Исследование структуры белков р-выступа большой субчастицы архейной
рибосомы»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.03 –молекулярная биология.

Актуальность исследования.

Рибосома это сложный комплекс рибонуклеиновых кислот и белков, ответственный за биосинтез белка в клетках всех живых организмов. Структурные исследования рибосомы вносят огромный вклад в понимание механизма работы аппарата трансляции. В последнее время был достигнут значительный прогресс в определении структуры рибосомы в целом и ее субчастиц. Однако, из-за сложности рибосомы и большой конформационной подвижности частей рибосомы в процессе работы установлены далеко не все структурно-функциональные закономерности работы рибосомы. В ряде случаев для понимания механизма функционирования рибосомы и уточнения данных о структуре рибосомы может быть успешно применен подход, связанный с изучением строения отдельных рибосомных белков и их комплексов с фрагментами РНК. Этот подход и был применен в диссертационной работе И.В. Митрошина для уточнения данных о строении р-выступа большой субчастицы архейной рибосомы.

В связи с вышеизложенным, тема диссертационной работы И.В. Митрошина «Исследование структуры белков р-выступа большой субчастицы архейной рибосомы» безусловно, **актуальна.**

Научная новизна работы и практическая ценность результатов.

В работе определена структура полноразмерного архейного рибосомного белка MjaL11. Впервые была визуализирована структура N-концевого домена этого белка. Определены структуры двойного комплекса N-концевого двухдоменного фрагмента архейного рибосомного белка MjaP0 со специфическим фрагментом 23S рРНК (MjaP0NTF-23SpРНК) и тройного комплекса N-концевого двухдоменного фрагмента архейного рибосомного белка MjaP0, белка MjaL11 со специфическим фрагментом 23S рРНК (MjaP0NTF-MjaL11-23SpРНК). В работе показано, что специфичный для архей и эукариот подвижный домен 2 белка P0 не взаимодействует с рРНК, а связывание белка MjaL11 с двойным комплексом не вызывает конформационных изменений в структуре фрагмента 23S рРНК. Также впервые закристаллизован тройной комплекс MjaP0NTF-MjaL11-23SpРНК с антибиотиком тиострептоном и определена его структура. Показано, что сайт связывания тиострептона расположен между 23S рРНК и N-концевым доменом белка L11, как и в бактериальной рибосоме. Полученные результаты имеют фундаментальное значение и вносят существенный вклад в уточнение модели структуры большой субчастицы архейной и эукариотической рибосом и в понимание структурных основ функционирования р-выступа в архейных и эукариотических рибосомах.

Диссертационная работа И.В. Митрошина написана по традиционной схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, выводов, списка цитируемой литературы. Работа изложена на 113 страницах машинописного текста, включает 9 таблиц, 45 рисунков. Список цитируемых литературных источников включает 150 наименований.

Во **Введении** диссертационной работы сформулированы цель и задачи исследования, описана актуальность темы, ее новизна и практическая значимость работы.

Глава 1 (Обзор литературы) В этой главе приведено краткое описание публикаций по структуре рибосомы, приведена классификация рибосомных белков. Основная часть обзора литературы посвящена строению р-выступа рибосом из различных источников. При этом, основное внимание уделено структурным исследованиям. Обзор литературы дает ясное современное представление о строении р-выступа рибосомы и является хорошим обоснованием цели и задач диссертационной работы.

Глава 2 (Экспериментальная часть.) В работе использован большой набор разнообразных современных молекулярно-биологических методов: методы геной инженерии, биохимические методы при работе с белками, биохимические методы при работе с РНК, методы получения РНК-белковых комплексов, методы кристаллизации макромолекул, методы белковой кристаллографии. Методы описаны подробно и грамотно. Глава свидетельствует о том, что автором проделана большая работа по освоению различных методов исследования, и что автор в совершенстве владеет ими.

Глава 3 (Результаты и обсуждения) состоит из двух разделов. Первый раздел содержит описание кристаллизации и определения структур компонентов р-выступа архейной рибосомы. Детально описано получение структур белка L11 в свободном состоянии, комплекса фрагмента белка P0 со специфическим фрагментом 23S рРНК, тройного комплекса белков L11 и P0 с 23S рРНК, и тройного комплекса с антибиотиком тиострептоном. Кроме того, описана процедура переуточнения структуры комплекса белка P0 с шестью копиями N-концевого домена белка P1 по дифракционным данным из банка белковых структур. Во втором разделе приведен анализ структур компонентов архейного рибосомного р-выступа, который позволил обосновать выводы диссертационной работы о вкладе определенных в ней структур в формирование функциональной модели рибосомы.

Выводы, сделанные автором, хорошо аргументированы и соответствуют поставленным в диссертационной работе задачам.

Работа хорошо написана и почти не содержит опечаток.

В качестве замечания можно высказать сожаление, что депонированные в банк белковых данных структуры (коды PDB: 5COL, 5D6G, 5D8H, 5DAR) закрыты до опубликования. Это затрудняет анализ решенных в работе структур. В частности, по приведенным в диссертации материалам (рисунок 35) невозможно убедиться в

правильности исключения второй конформации для белка L11. Включение структуры белка L10 (3JSY) в список белков депонированных в рамках диссертационной работы видимо следует считать ошибкой. В качестве пожелания можно высказать претензии к слишком подробному описанию процедуры уточнения каждой из структур в разделе определение и уточнение структур экспериментальной части, что привело к значительным повторам в разделе результаты при описании решения структур. Более удачной представляется схема, в которой в разделе методы остается только краткое описание методов, а все конкретные данные переносятся в раздел с результатами.

Содержание работы отражено в 15 публикациях, в том числе в 4 статьях и 11 тезисах. Результаты проведенных исследований представлены на многих международных и российских конференциях, что доказывает значимость работы. Полученные результаты достоверны, выводы аргументированы.

Таким образом, диссертационная работа Митрошина Ивана Владимировича «Исследование структуры белков р-выступа большой субчастицы архейной рибосомы» является полной и законченной. Научное и практическое значение работы не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Митрошина Ивана Владимировича соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а сам диссертант, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 –Молекулярная биология.

Отзыв обсужден и одобрен на семинаре лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии ИМБ РАН (протокол №4 от 12 ноября 2015г.)

Заведующий лабораторией конформационного полиморфизма белков в норме и патологии ИМБ РАН, д.б.н., академик РАН
по специальности 03.01.02 – Биофизика

Макаров Александр Александрович

111991, Москва, ул. Вавилова д.32
Тел. +7-499-135-40-95
aamakarov@eimb.ru

В.н.с. лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии ИМБ РАН, к.ф.-м.н.
по специальности 01.04.18 – Кристаллофизика и кристаллография

Поляков Константин Михайлович

111991, Москва, ул. Вавилова д.32
Тел. +7-499-135-99-44
kostya@eimb.ru



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

119991, ГСП, -1, г. Москва В-334, ул. Вавилова, 32. Для телеграмм: Москва В-334, ИМБ РАН.; л/с 06319001290 в ОФК по ЮЗАО г.Москвы, т.сч. 40503810300001009007, в Отделении №1 Московского ГТУ Банка России г.Москва 705, БИК 044583001, ИНН. БАНКА 7724189956 ОКПО – 02699501, ОКОНХ - 95110 тел. 135-23-11. 135-11-60; факс 135-14-05

17.11.2015 № 12312-9311

На № 11201-9311/257

В Диссертационный совет Д 501.001.76
при МГУ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук выражает свое согласие выступить в качестве ведущей организации и дать отзыв на диссертационную работу Митрошина Ивана Владимировича «Исследование структуры белков р-выступа большой субчастицы архейной рибосомы» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 –молекулярная биология. Отзыв будет подготовлен на основании заключения Лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии, поскольку одно из основных направлений научно-исследовательской деятельности Лаборатории соответствует специальности соискателя и теме диссертации.

ИМБ РАН подтверждает, что соискатель не является сотрудником института и не имеет научных работ по теме диссертации, подготовленных на базе данной организации, или соавторства с ее сотрудниками.

Сведения о ведущей организации прилагаются.

Зам. директора ИМБ РАН,
доктор биологических наук

(В.Л. Карпов)

Ученый секретарь ИМБ РАН,
кандидат химических наук

(Б.Л. Шаскольский)





ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

Сведения о ведущей организации

по диссертации Митрошина Ивана Владимировича «Исследование структуры белков р-выступа большой субчастицы архейной рибосомы» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 –молекулярная биология

<i>Полное наименование организации в соответствии с уставом</i>	<i>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук</i>
<i>Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом</i>	<i>ИМБ РАН</i>
<i>Ведомственная принадлежность</i>	<i>Федеральное Агентство Научных Организаций</i>
<i>Место нахождения</i>	<i>г. Москва, ул. Вавилова, д.32</i>
<i>Почтовый индекс, адрес организации</i>	<i>119991, г. Москва, ул. Вавилова, д.32</i>
<i>Адрес официального сайта в сети Интернет</i>	<i><u>www.eimb.ru</u></i>
<i>Телефон</i>	<i>+74991352311</i>
<i>Адрес электронной почты</i>	<i>isinfo@eimb.ru</i>

**Список публикаций
сотрудников**

**ведущей организации по
теме диссертации
соискателя в
рецензируемых научных
изданиях за последние 5
лет**

(не более 15 публикаций)

1:Kozin S.A., Kulikova A.A., Istrate A.N., Tsvetkov P.O., Zhokhov S.S., Mezentsev Y.V., Ivanov A.S., Polshakov V.I., Makarov A.A. The English (H6R) familial Alzheimer's disease mutation facilitates zinc-induced dimerization of the amyloid- β metal-binding domain. *Metallomics*, 2015, 7, 422-425.

2:Kulikova A.A., Tsvetkov P.O., Indeykina M.I., Popov I.A., Zhokhov S.S., Golovin A.V., Polshakov V.I., Kozin S.A., Nudler E.,Makarov A.A. Phosphorylation of Ser8 promotes zinc-induced dimerization of amyloid- β metal-binding domain. *Molecular BioSystems*, 2014, 10, 2590-2596.

3:Istrate A.N., Tsvetkov P.O., Mantsyzov A.B., Kulikova A.A., Kozin S.A., Makarov A.A., Polshakov V.I. NMR solution structure of rat A β (1-16): towards understanding the mechanism of rats' resistance to Alzheimer's disease. *Biophysical J.*,2012, 102, 136-143.

4: Trofimov AA, Polyakov KM, Lazarenko VA, Popov AN, Tikhonova TV, Tikhonov AV, Popov VO. Structural study of the X-ray-induced enzymatic reaction of octahaem cytochrome C nitrite reductase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2015, 71,1087-1094.

5: Glazunova OA, Polyakov KM, Fedorova TV, Dorovatovskii PV, Koroleva OV. Elucidation of the crystal structure of *Coriopsis caperata* laccase: restoration of the structure and activity of the native enzyme from the T2-depleted form by copper ions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2015, 71,854-961.

6: Safonova TN, Mikhailov SN, Veiko VP, Mordkovich NN, Manuvera VA, Alekseev CS, Kovalchuk MV, Popov VO, Polyakov KM. High-syn conformation of uridine and asymmetry of the hexameric molecule revealed in the high-resolution structures of *Shewanella oneidensis* MR-1 uridine phosphorylase in the free form and in complex with uridine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2014,70,3310-3319.

7: Osipov E, Polyakov K, Kittl R, Shleev S, Dorovatovsky P, Tikhonova T, Hann S, Ludwig R, Popov V. Effect of the L499M mutation of the ascomycetous *Botrytis aclada* laccase on redox potential and catalytic properties. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2014 ,70, 2913-2923.

8: Mitkevich VA, Schulga AA, Trofimov AA, Dorovatovskii PV, Goncharuk DA, Tkach EN, Makarov AA, Polyakov KM. Structure and functional studies of the ribonuclease binase Glu43Ala/Phe81Ala mutant. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2013, 69, 991-997.

9: Bezsudnova EY, Boyko KM, Polyakov KM,

	Dorovatovskiy PV, Stekhanova TN, Gumerov VM, Ravin NV, Skryabin KG, Kovalchuk MV, Popov VO. Structural insight into the molecular basis of polyextremophilicity of short-chain alcohol dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon Thermococcus sibiricus. Biochimie. 2012, 94,2628-2638. 10: Trofimov AA, Polyakov KM, Tikhonova TV, Tikhonov AV, Safonova TN, Boyko KM, Dorovatovskii PV, Popov VO. Covalent modifications of the catalytic tyrosine in octahaem cytochrome c nitrite reductase and their effect on the enzyme activity. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2012,68,144-153. 11: Trofimov AA, Polyakov KM, Boyko KM, Tikhonova TV, Safonova TN, Tikhonov AV, Popov AN, Popov VO. Structures of complexes of octahaem cytochrome c nitrite reductase from Thioalkalivibrio nitratreducens with sulfite and cyanide. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2010 ,66, 1043-1947
--	--

«Верно»

Учёный секретарь ИМБ РАН,
Кандидат химических наук



Шаскольский

Б.Л. Шаскольский

« 17 » *ноября* 2015 года.