

Заключение диссертационного совета МГУ.02.03

по диссертации на соискание учёной степени доктора химических наук

Решение диссертационного совета от «24» сентября 2019 г. № 22

О присуждении Никулину Алексею Донатовичу, гражданину РФ,
учёной степени доктора химических наук.

Диссертация «Структурные принципы взаимодействия белков-регуляторов трансляции с РНК» по специальностям 02.00.10 – «биоорганическая химия», 03.01.03 – «молекулярная биология» принята к защите диссертационным советом 25 июня 2019 г., протокол № 18.

Соискатель Никулин Алексей Донатович, 1968 года рождения, в 1994 г. соискатель окончил с отличием Красноярский государственный университет, в 1996 г. – магистратуру Пушкинского государственного университета, в 1999 г. - аспирантуру Пушкинского государственного университета. Диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук «Пространственная структура комплекса рибосомного белка S15 с рРНК» защитил в 2000 году в диссертационном совете Д 053.05.47 при МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, по специальности 02.00.10 биоорганическая химия.

Соискатель работает в должности заместителя директора по науке Института белка Российской академии наук, Московская область, г. Пущино.

Диссертация выполнена в Группе структурных исследований рибосомных белков и Лаборатории структурных исследований аппарата трансляции Института белка РАН.

Научный консультант - **Гарбер Мария Борисовна**, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Лаборатории структурных исследований аппарата трансляции ИБ РАН.

Официальные оппоненты:

Попов Владимир Олегович - член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор, ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН», главный научный сотрудник дирекции, заведующий лабораторией инженерной энзимологии;

Сергиев Пётр Владимирович - доктор химических наук, профессор кафедры химии природных соединений химического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова;

Лунин Владимир Юрьевич - доктор физико-математических наук, заведующий Лабораторией кристаллографии макромолекул Института математических проблем биологии РАН - филиала ФГУ «Федеральный исследовательский центр Институт прикладной математики им. М. В. Келдыша Российской академии наук»

дали положительные отзывы на диссертацию.

Соискатель имеет 64 опубликованные работы по БД Web of Science (h=17); по теме диссертации 28 публикаций, из них 21 статья в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science и Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальностям 02.00.10 - биоорганическая химия, 03.01.03 - молекулярная биология.

1. Никонова Е. Ю., Волчков С. А., Кляшторный В. Г., Тищенко С. В., Костарева О. С., Невская Н. А., Никонов О. С., Габдулхаков А. Г., **Никулин А. Д.**, Давыдова Н. Л., Стрельцов В. А., Гарбер М. Б., Никонов С. В. Кристаллические структуры мутантных форм рибосомного белка L1 // *Молекулярная биология*. - 2007. - Т. 41, - № 4. - С. 688-696. WoS IF = 0,932
2. Мурина В. Н., Мельник Б. С., Филимонов В. В., Улайн М., Вейсс М. С., Мюллер У., **Никулин А. Д.** Влияние замен консервативных аминокислотных остатков на структуру и стабильность белка Hfq // *Биохимия*. - 2014. - Т. 79, - № 5. - С. 595-604. WoS IF = 1,886
3. Мурина В. Н., Селиванова О. М., Михайлина А. О., Казаков А. С., Никонова Е. Ю., Леконцева Н. В., Тищенко С. В., **Никулин А. Д.** Надмолекулярная организация фибрилл Hfq-подобных белков // *Биохимия*. - 2015. - Т. 80, - № 4. - С. 517-526. WoS IF = 1,886
4. Garber M., Gongadze G., Meshcheryakov V., Nikonov O., **Nikulin A.**, Perederina A., Piendl W., Serganov A., Tishchenko S. Crystallization of RNA/protein complexes // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. - 2002. - V. 58, - P. 1664-1669. WoS IF = 3,227
5. Vassilieva Yu., **Nikulin A. D.**, Blasi U., Moll I. and Garber M. B. Crystallization of Hfq protein: a bacterial gene-expression regulator // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. - 2003. - V. 59, - №6. - P. 1061-1063. WoS IF = 3,227
6. **Nikulin A.**, Eliseikina I., Tishchenko S., Nevskaya N., Davydova N., Platonova O., Piendl W., Selmer M., Liljas A., Drygin D., Zimmermann R., Garber M. and Nikonov S. Structure of the L1 protuberance in the ribosome // *Nature Structural Biology*. - 2003. - V. 10, - №2. - P. 104-108. WoS IF = 12,109
7. Ehresmann C., Ehresmann B., Ennifar E., Dumas P., Garber M., Mathy N., **Nikulin A.**, Portier C., Patel D., Serganov A. Molecular mimicry in translational regulation: the case of ribosomal protein S15 // *RNA Biology*. - 2004. - V. 1, - №1. - P. 66-73. WoS IF = 5,477
8. **Nikulin A.**, Stolboushkina E., Perederina A., Vassilieva I., Blasi U., Moll I., Kachalova G., Yokoyama S., Vassilyev D., Garber M., Nikonov S. Structure of *Pseudomonas aeruginosa* Hfq protein // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. - 2005. - V. 61, - №2. - P. 141-146. WoS IF = 3,227
9. Nevskaya N., Tishchenko S., Gabdoulkhakov A., Nikonova E., Nikonov O., **Nikulin A.**, Platonova O., Garber M., Nikonov S., Piendl W. Ribosomal protein L1 recognizes the same

specific structural motif in its target sites on the autoregulatory mRNA and 23S rRNA // *Nucleic Acids Res.* - 2005. - V. 33, - №2. - P. 478-485. WoS IF = 11,147

10. Nevskaya N., Tishchenko S., Volchkov S., Kljashtorny V., Nikonova E., Nikonov O., **Nikulin A.**, Kohrer C., Piendl W., Zimmermann R., Stockley P., Garber M., Nikonov S. New insights into the interaction of ribosomal protein L1 with RNA // *Journal of Molecular Biology.* - 2006. - V. 355, - №4. - P. 747-759. WoS IF = 5,067
11. Tishchenko S., Nikonova E., **Nikulin A.**, Nevskaya N., Volchkov S., Piendl W., Garber M., Nikonov S. Structure of the ribosomal protein L1-mRNA complex at 2.1 Å resolution: common features of crystal packing of L1-RNA complexes // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography.* - 2006. - V. 62, - №12. - P. 1545-1554. WoS IF = 3,227
12. Tishchenko S., Kljashtorny V., Kostareva O., Nevskaya N., **Nikulin A.**, Garber M., Nikonov S., Gulak P., Piendl W. Domain II of *Thermus thermophilus* Ribosomal Protein L1 Hinders Recognition of Its mRNA // *Journal of Molecular Biology.* - 2008. - V. 383, - № 2. - P. 301-305. WoS IF = 5,067
13. Moskaleva O, Melnik B, Gabdulkhakov A, Garber M, Nikonov S, Stolboushkina E, **Nikulin A.** The structures of mutant forms of Hfq from *Pseudomonas aeruginosa* reveal the importance of the conserved His57 for the protein hexamer organization // *Acta Crystallographica Section F.* - 2010. - V. 66, - № 7. - P. 760-764. WoS IF = 1,199
14. Kostareva O., Tishchenko S., Nikonova E., Kljashtorny V., Nevskaya N., **Nikulin A.**, Sycheva A., Moshkovskii S., Piendl W., Garber M. and Nikonov S. Disruption of shape complementarity in the ribosomal protein L1-RNA contact region does not hinder specific recognition of the RNA target site. // *Journal of Molecular Recognition.* - 2011. - V. 24, - №4. - P. 524-532. WoS IF = 1,919
15. Murina V. N., **Nikulin A. D.** RNA-binding Sm-like proteins of bacteria and archaea. Similarity and difference in structure and function // *Biochemistry (Moscow).* - 2011. - V. 76, - №13. - P. 1434-1449. WoS IF = 1,886
16. Murina V., Lekontseva N. and **Nikulin A.** Hfq binds ribonucleotides in three different RNA-binding sites // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography.* - 2013. - V. 69, - P. 1504-1513. WoS IF = 3,227
17. Lekontseva N., Murina V., Nikonova E., Selivanova O., Tishchenko S., **Nikulin A.** Investigation of RNA-binding properties and oligomerization behavior of Sm-like archaeal proteins // *FEBS Journal.* - 2015. - V. 282, - № SI. - P. 341. WoS IF = 4,739
18. Murina V. N, **Nikulin A. D.** Bacterial Small Regulatory RNAs and Hfq Protein // *Biochemistry (Moscow).* - 2015. - V. 80, - № 13. - P. 1647-1654. WoS IF = 1,886
19. **Nikulin A.**, Mikhailina A., Lekontseva N., Balobanov V., Nikonova E., Tishchenko S. Characterization of RNA-binding properties of the archaeal Hfq-like protein from *Methanococcus jannaschii* // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics.* - 2017. - V. 35, - № 8. - P. 1615-1628. WoS IF = 3,310
20. Nemchinova M., Balobanov V., Nikonova E., Lekontseva N., Mikhaylina A., Tishchenko S., **Nikulin A.** An Experimental Tool to Estimate the Probability of a Nucleotide Presence in the Crystal Structures of the Nucleotide-Protein Complexes // *Protein Journal.* - 2017. - V. 36, - №3. - P. 157-165. WoS IF = 1,029
21. **Nikulin A. D.** Structural Aspects of Ribosomal RNA Recognition by Ribosomal Proteins // *Biochemistry (Moscow).* - 2018. - V. 83, - № 13. - P. S111-S133. WoS IF = 1,886

На автореферат диссертации поступило 3 дополнительных отзыва, все положительные.

Выбор официальных оппонентов обосновывался их высокой компетентностью в области представленной диссертационной работы и наличием публикаций по биоорганической химии и молекулярной биологии. Двое оппонентов являются докторами химических наук, один - доктор физико-математических наук.

Диссертационный совет отмечает, что представленная диссертация на соискание учёной степени доктора химических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны положения, совокупность которых можно квалифицировать как научные достижения.

Впервые определены структуры рибосомного белка L1 в комплексе со специфически узнаваемыми участками 23S рРНК и мРНК. Структура комплекса L1-23S рРНК использована для описания функционально важного L1-выступа большой рибосомной субчастицы. Сравнение структур рибосомного и регуляторного комплексов рибосомного белка L1 позволило на атомарном уровне объяснить механизм регуляции трансляции мРНК L1 оперона по принципу обратной связи.

Впервые определена структура белка Hfq из бактерии *Pseudomonas aeruginosa* в свободном состоянии и в комплексе с рибонуклеотидами. Установлена уникальная термостабильность белка; предложено объяснение высокой стабильности четвертичной структуры Hfq. Проведён анализ взаимодействия аминокислотных остатков белка с уридином и аденином; впервые показана способность белка Hfq связывать цитидин. Идентифицирован и описан функционально важный третий РНК-связывающий участок белка Hfq, расположенный на боковой поверхности гексамера белка, что позволило детализировать модель регуляции трансляции мРНК с участием мРНК.

Впервые определены структуры архейных Lsm белков SmAP из *Methanocaldococcus jannaschii* и *Sulfolobus acidocaldarius*; уточнена структура SmAP белка из *Methanocaldococcus jannaschii* с высоким разрешением. На структурном и функциональном уровне установлено, что SmAP белки имеют только один участок специфического узнавания уридин-богатых участков оцРНК.

Разработана простая и эффективная методика идентификации участков белка, контактирующих с оцРНК в их комплексах. Методика может применяться при структурно-функциональных исследованиях других оцРНК-связывающих белков.

Определение структур высокого разрешения целого ряда РНК-белковых комплексов в комбинации с данными физико-химических и биохимических исследований позволило установить структурные принципы узнавания белками-регуляторами РНК - «мишеней». Эти

данные могут использоваться, в том числе, для создания химерных белков для направленной регуляции синтеза белков для медицинских и технологических целей.

Диссертация представляет собой самостоятельное законченное исследование, обладающее внутренним единством. Положения, выносимые на защиту, содержат новые научные результаты и свидетельствуют о личном вкладе автора в науку.

- Рибосомный белок L1 узнает консервативную пространственную структуру на 23S рРНК и мРНК, формируемую петлей с прилегающими спиралями РНК. Узнавание белок-РНК происходит на уровне комплементарности поверхностей двух молекул. Стабильность РНК-белковых комплексов преимущественно определяется консервативными, недоступными для растворителя водородными связями. Первый домен белка L1 играет определяющую роль во взаимодействии с РНК.
- Белок Hfq имеет высокую термостабильность и устойчивость к денатурантам благодаря формированию общего гидрофобного ядра гексамера белка, закрытого от растворителя консервативными аминокислотными остатками. Замены этих остатков на аланины приводят к драматическому понижению стабильности гексамера белка Hfq.
- Белок Hfq специфически связывает УТФ и АТФ, но не связывает ГТФ. Рибонуклеотиды взаимодействуют с белком в РНК-связывающих участках, причем основания нуклеотидов занимают положение и формируют контакты с атомами белка, строго соответствующие таковым в комплексах РНК с Hfq. На основе этого наблюдения предложена методика идентификации участков взаимодействия РНК-связывающих белков с оцРНК.
- Архейные Lsm белки SmAP сохраняют только один участок специфического взаимодействия с оцРНК, который соответствует уридин-специфическому участку белка Hfq. В отличие от белка Hfq белки SmAP способны разрушать вторичную структуру РНК в отсутствие комплементарной РНК (например, мРНК), однако сохраняют свойство способствовать их взаимодействию.
- Белки, взаимодействующие с одноцепочечными и двухцепочечными участками РНК, используют разные стратегии узнавания РНК: в случае дцРНК происходит узнавание уникальной конформации пространственной структуры РНК, в случае оцРНК идет узнавание белками последовательности нуклеотидов. Белки Hfq/SmAP для повышения сродства к одноцепочечным РНК используют стратегию дубликации узнающих доменов белка, что позволяет увеличить сродство белка к РНК.

На заседании 24 сентября 2019 года диссертационный совет принял решение присудить Никулину Алексею Донатовичу учёную степень доктора химических наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 15 человек, из них 14 докторов наук, участвовавших в заседании, из 18 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 15, против 0, недействительных бюллетеней 0.

Председатель Совета

д.х.н., профессор, академик РАН

Богданов А. А.

Учёный секретарь Совета,

кандидат химических наук,

доцент

Смирнова И. Г.

24 сентября 2019 г.