

## О Т З Ы В

**официального оппонента на диссертацию Лаптева Ивана Георгиевича «Новые метилтрансферазы митохондриальной рРНК», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия**

**АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ.** Во всех живых организмах жизнеспособность клеток зависит от правильного функционирования важнейших надмолекулярных структур – рибосом, осуществляющих трансляцию генетической информации от последовательностей кодонов мРНК в аминокислотные последовательности синтезируемых белков. Точность трансляции зависит от согласованной работы рибосомных компонентов, в частности рРНК, которые несут постранскрипционные модификации, необходимые для правильного сворачивания их структуры. К настоящему времени идентифицированы сайты модификации в рРНК бактериальных и эукариотических рибосом и установлено, что число модифицированных нуклеотидных остатков в рРНК митохондриальных рибосом млекопитающих (мт-рРНК) значительно ниже, чем в рРНК бактериальных и эукариотических цитоплазматических рибосом. Существует точка зрения, основанная на предположении о происхождении митохондрий от бактериального предшественника, что в рРНК миторибосом в процессе эволюции остались только самые важные для их функционирования модификации. Почти для всех модификаций в мт-рРНК млекопитающих найдены соответствующие ферменты и показано, что эти модификации важны для правильной сборки рибосомных субчастиц, а их отсутствие может приводить к нарушениям митохондриальной трансляции. Однако белки, ответственные за метилирование остатков U429 и C839 по атомам C5 и N4 соответственно в 12S мт-рРНК, оставались неизвестными. Следовательно, диссертационная работа Лаптева И. Г., посвящённая определению белков, участвующих в метилировании указанных остатков 12S мт-рРНК, и

установлению их функциональной роли, является актуальным исследованием.

**НАУЧНАЯ НОВИЗНА.** В диссертационной работе Лаптева И. Г. с использованием специально разработанных линий клеток мыши с инактивированными генами *Mettl15* и *Trmt2b* впервые установлена роль белков METTL15 и TRMT2B в модификации митохондриальной 12S рРНК и, таким образом, получен окончательный список ферментов, ответственных за метилирование мт-рРНК млекопитающих.

**ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ.** Диссертационная работа Лаптева И.Г. выявила белки, отвечающие за появление m<sup>5</sup>U и m<sup>4</sup>C в положениях 425 и 840 соответственно митохондриальной 12S рРНК, и высветила некоторые аспекты, касающиеся их функциональной роли. Полученные знания вносят вклад в понимание назначения метилирования 12S рРНК в митохондриальных рибосомах млекопитающих.

**СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ.** Диссертация изложена на 110 страницах и содержит 30 рисунков и 20 таблиц. Она построена в основном классическим образом и содержит разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», «Список цитируемой литературы», включающий 144 источника, и «Приложение», содержащее дополнительные рисунки и таблицы.

**КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСНОВНОГО СОДЕРЖАНИЯ ДИССЕРТАЦИИ.** Во «Введении» кратко изложены актуальность проблемы, степень разработанности темы, цель, задачи, объект и предмет исследования, его научная новизна вместе с теоретической и практической значимостью, а также использованная в работе методология. Здесь же даны основные положения, выносимые на защиту, и приведена информация об апробации работы, количестве публикаций и личном вкладе автора.

Обзор литературы посвящен модификациям нуклеотидов митохондриальных рРНК. Диссертант раскрывает особенности

митохондриального аппарата трансляции млекопитающих. Далее он даёт описание модификаций нуклеотидных остатков рРНК митохондриальных рибосом млекопитающих и дрожжей, а также модификаций эквивалентных нуклеотидов в эукариотических цитоплазматических и бактериальных рибосомах. В заключении диссертант приводит таблицу, где суммированы изложенные в обзоре литературные данные. Эта таблица ясно показывает, что рРНК миторибосом млекопитающих содержит меньшее количество нуклеотидов с постраскрипционными модификациями по сравнению с рРНК бактериальных и цитоплазматических рибосом и что отсутствие таких нуклеотидов в миторибосомах приводит к более серьезным последствиям, чем в бактериальных рибосомах. В целом, обзор литературы достаточно информативен, хорошо иллюстрирован, легко читается и даёт практически полное представление о решаемой проблеме.

Глава «Материалы и методы» содержит описание широкого спектра современных молекулярно-биологических и биохимических подходов, использованных в работе. Среди них дизайн и создание генетических конструкций, методы работы с клеточными культурами, выделение специфических РНК с помощью биотинированных ДНК-олигонуклеотидов, иммунопреципитация, выделение митохондрий, получение профилей митохондриальных рибосом, масс-спектрометрия РНК и белков и ряд других.. Все методики представлены достаточно подробно, что позволяет их воспроизвести или использовать в лабораторных протоколах.

Глава «Результаты» содержит несколько разделов. Первый раздел касается постановки задачи. Из этого раздела становится ясно, что диссертация Лаптева И.Г. посвящена подтверждению выдвинутых ранее в лаборатории гипотез о том, что белки METTL15 и TRMT2B являются метилтрансферазами, причастными к появлению в 12S мт-рРНК млекопитающих метилированных нуклеотидов m<sup>4</sup>C839 и m<sup>5</sup>U429 соответственно, и изучению их функциональной роли. В качестве модельного организма выбраны клеточные линии мыши с

инактивированными генами *Mettl15* и *Trmt2b*, для создания которых диссертант применил систему редактирования генома CRISPR-Cas9. Для доставки нуклеазы Cas9 в клетки он использовал специально разработанную плазмиду, позволяющую экспрессию в эукариотических клетках генов самой нуклеазы Cas9 и подобранной гидовой РНК, к которой добавлена часть, комплементарная целевому месту в геноме. Для проверки вышеупомянутой гипотезы Лаптев усовершенствовал разработанный ранее метод выделения специфических РНК. Он ввел гибридизацию суммарной РНК с ~40-звенными биотинилированными по 5'-концу ДНК-олигонуклеотидами, комплементарными участкам митохондриальной рРНК с исследуемыми модифицированными нуклеотидами. Сравнивая масс-спектры фрагментов РНК, полученных на основе выделенных РНК, от клеток дикого типа и клеток с инактивированными генами *Mettl15* и *Trmt2b*, диссертант блестяще подтвердил вышеупомянутую гипотезу, показав, что мишенью белков METTL15 и TRMT2B действительно является 12S рРНК митохондрий. Более того, он выявил влияние METTL15 на метилирующую активность белка NSUN4. То, что отсутствие метилирования в используемых клеточных линиях мыши обусловлено именно инактивацией целевых генов, было подтверждено экспериментами по частичному восстановлению их активностей с помощью системы транспозонов. Кроме того, Лаптев продемонстрировал также, что TRMT2B метилирует почти все митохондриальные тРНК, Т-петля которых начинается на UU. Далее с помощью разных способов диссертант проанализировал влияние инактивации изучаемых генов на процессы, протекающие в митохондриях. Выяснилось, что отсутствие белка TRMT2B влияет на эффективность работы комплексов дыхательной цепи, что было достоверно показано с использованием специального прибора, который измеряет концентрацию кислорода в ячейке. Чтобы понять, на какой стадии TRMT2B и METTL15 принимают участие в созревании митохондриальных рибосом, Лаптев ввел гены, кодирующие целевые белки, меченные 3xFLAG на С-конце и

содержащие сайт разрезания HRV 3С протеазой между белком и 3xFLAG, в клеточные линии с инактивированными генами *Trmt2b* и *Mettl15*. С помощью иммунопреципитации 3xFLAG-меченых белков из соответствующих клеточных лизатов он показал, что METTL15 взаимодействует с фактором сборки малой субчастицы митохондриальной рибосомы. Для проверки влияния METTL15 на белковый состав субчастиц диссертант провел полуколичественный протеомный анализ фракций сахарозных градиентов от экстрактов клеток дикого типа, клеток с инактивированным *Mettl15* и полученных на их основе клеток с суперэкспрессией гена *Mettl15*, дикого типа или кодирующего белок с мутацией D169R. В результате ему удалось показать, что отсутствие каталитически активного белка METTL15 в клетках приводит к снижению эффективности ассоциации субчастиц митохондриальной рибосомы.

Интерпретация экспериментальных результатов, предложенная соискателем, аргументирована; их достоверность не вызывает сомнений, поскольку все они подкреплены надлежащими контролями.

Отдельная глава в диссертации посвящена обсуждению результатов. Лаптев рассматривает полученные результаты в свете имеющихся литературных данных по изучаемой проблеме, что позволяет ему сделать обсуждение интересным и предложить ряд оригинальных гипотез.

Раздел «Выводы» дает представление о масштабе проделанной работы, а также новизне и актуальности полученных данных. Выводы достаточно лаконичны и полностью обоснованы.

**ЗАМЕЧАНИЯ ПО РАБОТЕ.** Во введении к обзору можно было бы упомянуть, какие вопросы в нем рассмотрены и какой период времени охватывает цитируемая литература. Осталось непонятным, почему в разделе «Степень разработанности темы» речь идет об остатках m<sup>5</sup>U429 и m<sup>4</sup>C839 12S мт-тРНК, хотя метилированными оказались остатки U и C в положениях 425 и 840. В разделе «Постановка задачи» главы «Результаты» также подчеркнуто, что целью данной работы является подтверждение гипотез о

том, что METTL15 и TRMT2B являются метилтрансферазами, ответственными за появление m<sup>4</sup>C839 и m<sup>5</sup>U429 в 12S рРНК млекопитающих. Однако причина вышеуказанных различий в положениях метилированных остатков четко не объяснена. В соответствующих главах диссертации отсутствуют рассуждения относительно того, почему в позднем интермедиате сборки 28S субчастицы, оказавшемся мишенью для METTL15, практически не обнаружено m<sup>5</sup>S37 и почти нет m<sup>5</sup>S38 и m<sup>5</sup>S39. Не препятствовал ли их включению в субчастицы присутствовавший в них фактор сборки RBFA, или их отсутствие вызвано другими причинами? Хотя автор и пытался затронуть этот вопрос в главе «Обсуждение», в общем, осталось неясным, на какой стадии сборки 28S субчастицы включаются указанные рибосомные белки. В диссертации отсутствует раздел «Заключение», в котором мог бы быть представлен основной финальный вывод из всего исследования и где могли бы быть раскрыты позиция автора по избранной научной проблеме и место полученных результатов в развитии этой проблемы.

Отмеченные недостатки не носят принципиального характера, не влияют на её основные результаты и не умаляют вклада автора в соответствующую область исследования. Все результаты имеют высокую актуальность, фундаментальную значимость и научную новизну. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. Результаты диссертации отражены в 3 научных статьях, опубликованных в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science и Scopus: *Nucleic Acids Res.*, *RNA biology* and *Cells*. Во всех этих статьях И. Г. Лаптёв является первым автором. Результаты работы доложены на 3 международных конференциях.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Всё вышеизложенное позволяет заключить, что диссертация Ивана Георгиевича Лаптева «Новые метилтрансферазы митохондриальной рРНК», является законченным научным исследованием, отвечающим требованиям, установленным Московским государственным

университетом имени М.В. Ломоносова к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 02.00.10 – «Биоорганическая химия», а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова. Работа оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова. Считаю, что соискатель Лаптев Иван Георгиевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.10 – «Биоорганическая химия».

Официальный оппонент:

заведующая лабораторией структуры и функции рибосом  
Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,  
доктор химических наук, профессор

Карпова Галина Георгиевна  
15.01.2021

Контактные данные:

тел.: +7-(383)-363-51-40, e-mail: karpova@niboch.nsc.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом  
защищена диссертация: 03.01 .03 – молекулярная биология

Адрес места работы:

630090, Новосибирск, пр. Лаврентьева, д. 8,

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Тел.: +7-(383)-363-51-40

E-mail: karpova@niboch.nsc.ru

Подпись Карповой Галины Георгиевны удостоверяю

