

ОТЗЫВ

официального оппонента Лябина Дмитрия Николаевича
на диссертационную работу Дерябина Александра Сергеевича
«РОЛЬ БЕЛКОВ RPF1 И ESF1 В ПРОЦЕССИНГЕ ПРЕ-рРНК ЧЕЛОВЕКА»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Диссертационная работа А.С. Дерябина посвящена исследованию роли белков RPF1 и ESF1 процессинге пре-рибосомальной РНК человека.

Актуальность диссертационного исследования

Биогенез рибосом, эукариот в частности – чрезвычайно сложный процесс формирования зрелых (компетентных к трансляции) рибосомальных частиц, в который вовлечены сотни белков и некодирующих РНК. Он представляет собой совокупность координированных во времени и пространстве процессов транскрипции рРНК, её модификации и процессинга, приобретения необходимой третичной структуры, присоединения рибосомальных белков и транспорта рибосомных частиц в цитоплазму. Исследование механизмов сборки рибосом высших эукариот является не только малоизученной и актуальной фундаментальной задачей (возможно, более сложной, чем функционирование самих рибосом), но имеет и прикладной интерес, поскольку понимание работы ключевых регуляторов биогенеза рибосом потенциально может иметь важное значение, например, для терапии некоторых рибосомопатий.

Таким образом, тема диссертационной работы А.С. Дерябина «Роль белков RPF1 и ESF1 в процессинге пре-рРНК человека» обладает несомненной актуальностью и представляет большой интерес для понимания роли белков RPF1 и ESF1 в биогенезе рибосом.

Структура работы

Материал диссертации изложен на 100 страницах машинописного текста, который включает в себя 26 рисунков. Диссертационная работа написана в соответствии с требованиями к оформлению работ и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Выводы», «Список литературы», который содержит 211 ссылок.

Научная новизна и практическая значимость работы

Диссертационная работа А.С. Дерябина сфокусирована на двух белках, RPF1 и ESF1, функции которых в биогенезе рибосом высших эукариот до сих пор не были исследованы. Проведенное исследование позволяет продвинуться в понимании молекулярных механизмов участия белков RPF1 и ESF1 в биогенезе рибосом. В частности, было показано, что нокаун белков человека RPF1 и ESF1 приводит к нарушениям процессинга пре-рибосомной РНК, которые свидетельствуют о нарушении разрезания по сайтам 4 и A0, соответственно. Результаты демонстрируют количественные изменения различных пре-рРНК, изменение поведения некоторых ядрышковых белков вследствие нокауна RPF1 и ESF1, изменение активности РНК полимеразы I при нокауне RPF1, а также полисомные профили клеток с нокауном данных факторов. Эти данные дополняют и расширяют понимание биогенеза рибосом в клетках высших эукариот, а также показывают его лабильность и тонкую регулировку в зависимости от условий существования клетки.

Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов

Положения, сформулированные в диссертации А.С. Дерябина, основаны на достаточном объеме фактического материала. Выводы обоснованы совокупностью приведенных данных. Статистическая обработка экспериментальных данных адекватна, их достоверность не вызывает сомнений.

Оценка содержания диссертационной работы и ее завершенности

Диссертационная работа А.С. Дерябина по своей структуре и качеству изложения материала соответствует самым высоким стандартам. Во «Введении» автор формулирует цели и задачи работы, Здесь же обосновывается ее актуальность, теоретическая и практическая значимость. Обзор литературы посвящен в большей степени биогенезу рибосомных субчастиц у эукариот. Особое внимание уделяется процессингу пре-рРНК. Отдельно рассматриваются белки RPF1 и ESF1 и имеющиеся в научной литературе данные о их роли в процессинге пре-рРНК низших эукариот. Иллюстративный материал в достаточной степени способствует пониманию описываемого материала.

Раздел «Материалы и методы исследования» содержит описание использованных в работе материалов, а также 14 подразделов с достаточно

подробным описанием примененных автором методик, которые полностью соответствует поставленным экспериментальным задачам.

В разделе «Результаты и их обсуждение» автор представляет полученные данные и сопровождает их достаточно развернутым обсуждением. Несомненным плюсом этого раздела является то, что автор предваряет практически каждый подраздел или пункт объяснением того, зачем эксперимент будет проводиться. Это в значительной мере упрощает понимание логики работы. Необходимо отметить высокое экспериментальное мастерство, проявленное автором при выполнении диссертационной работы (выделение ядрышек, работа с РНК центрифугирование в градиенте концентраций сахарозы). Раздел «Выводы» содержит 5 утверждений, которые не вызывают серьезных нареканий.

Важно отметить, что количество ошибок и опечаток в рукописи крайне мало, что, безусловно, облегчает чтение диссертации.

В целом после прочтения рукописи не остается сомнений в научной значимости диссертационной работы, а также в ее потенциальной пользе для будущих фундаментальных и прикладных исследований.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертационной работы оформлен по стандартной схеме и соответствует установленным требованиям, материал автореферата точно и достоверно отражает результаты проведенных исследований, дает исчерпывающее представление о содержании диссертации и степени участия автора в исследованиях.

Замечания к диссертационной работе

Ниже приводятся несколько вопросов и замечаний к работе Александра Сергеевича Дерябина. Однако стоит сразу отметить, что довольно большое их количество ни в коем случае не умаляет научную значимость диссертации, поскольку все замечания носят уточняющий характер или диктуются желанием рецензента узнать еще больше о предмете исследования и его будущем.

Замечания к разделу «Обзор литературы»

1. В обзоре литературы довольно подробно рассмотрены стадии синтеза и процессинга рРНК, но при этом не рассматриваются даже в общих чертах этапы присоединения рибосомных белков, которые безусловно важны и для биогенеза и, конечно, для функционирования рибосом.

2. Описание белков RPF1 и ESF1 сфокусировано на их функциях, в то время как о структуре, РНК-связывающих свойствах лишь вскользь упоминается. Хотелось бы более подробной характеристики этих белков, хотя бы их дрожжевых гомологов.

Основные замечания к разделу «Результаты и обсуждения»

1. К экспериментам по нокауту RPF1 и ESF1 не лишним было бы провести эксперименты по восстановлению синтеза белков после их выключения и проследить за восстановлением тех или иных исследуемых параметров.
2. С чем по вашему связано изменение локализации RPF1 и ESF1 при уменьшении их количества. Нужна ли некоторая критическая концентрация для его локализации в ядрышках? Каковы причины выхода NPM1 в нуклеоплазму (не изменилось ли и его количество)?
3. По разделу 3.2. так и не сделан вывод о роли NPM1 в наблюдаемых эффектах, хотя в начале этого раздела, казалось, это подразумевалось. Как мне кажется не четко сделан вывод о том, что всё произошло при нокауте RPF1: произошло увеличение синтеза рРНК и она не успевает процессироваться, или нарушен процессинг и поэтому накапливается непроцессированный предшественник. Было бы важно провести аналогичный эксперимент в условиях временной экспрессии siRNA против RPF1 и при выключении ESF1.
4. Любопытно различие в процессинге пре-рРНК при использовании shRNA и siRNA против RPF1, что, на мой взгляд, может быть связано не только с влиянием RPF1 на более ранние стадии процессинга, но и с зависимостью влияния RPF1 на процессинг от его количества, при уменьшении которого изменяется локализация RPF1 согласно вашим данным. С этой точки зрения интересно, есть ли подобный эффект (различия shRNA и siRNA) в случае выключения синтеза ESF1.
5. Рисунок 24. При сопоставлении профиля сахарозного градиента с нозерн- и вестерн-блотами фракций градиента, можно увидеть, что пики оптической плотности (обозначенные как «содержащие RPF1 пре-60S предшественники» или «содержащие ESF1 пре-40S предшественники») не вполне соотносятся с содержанием 28S, 18S или даже 32S, а также с содержанием белков RPF1 и ESF1, а «идут» выше их по градиенту. Чему бы могли соответствовать по мнению автора эти пики?
6. К пункту 3.6. Возможно, в случае RPF1 лучше было бы использовать siRNA, чтобы добиться большего снижения количества этого белка, и тогда, возможно, изменения, например, содержания 60S субчастиц. Кроме того,

отсутствие глобальных изменений в профиле полисом (хотя в случае shRNA#1 ESF1 можно заметить уменьшение оптической плотности в полисомных фракциях (рис. 25Б верхняя панель) может и не соответствовать сохранению трансляционной активности. Определение метаболической активности тоже является косвенным доказательством. Для измерения же трансляционной активности клеток можно было предложить эксперимент с метаболическим мечением вновь синтезируемых белков с помощью [³⁵S]-метионина или азидогомоаланина (с последующей клик-реакцией с флюорофором-алкином, например) и более количественным определением изменений в трансляции. Помимо этого хочется добавить, что для наилучшего анализа полисомных профилей желательно использовать проточную ячейку с непрерывным измерением оптической плотности, а не анализировать оптическую плотность собранных фракций.

7. Не проводились ли автором или его коллегами попытки определения мест связывания исследуемых белков с фрагментами пре-рРНК, например, методами УФ- или химических сшивок, или может быть методами высокопроизводительного секвенирования (eCLIP). Что вообще известно о РНК-связывающих свойствах этих белков или, может быть, эти свойства не важны для их функционирования. В перспективе было бы важно провести эксперименты по восстановлению синтеза RPF1 и ESF1 после соответствующих нокдаунов с помощью белков дикого типа и белков с мутациями (делениями) в РНК связывающих доменах.

минорные замечания к разделу «Результаты и обсуждения»:

8. В чем различие верхней и нижней панелей на рисунке 14 А и Б из текста диссертации и подписи не вполне ясно.
9. На рисунках 19-23 хорошо было бы привести уровни статистической значимости наблюдаемых изменений.

Заключение

По теоретической и практической значимости результатов проведенного исследования, актуальности выбранной темы, научной новизне, достоверности и обоснованности научных результатов диссертационная работа Александра Сергеевича Дерябина полностью соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748;

29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. №1539; 26.09.22 г. №1690; 26.01.2023 г. №101), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на межлабораторном семинаре группы регуляции биосинтеза белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук.

Д.б.н., ведущий научный
сотрудник группы регуляции
биосинтеза белка Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Институт белка
Российской академии наук



Лябин Дмитрий Николаевич

18 ноября 2024 г.

Московская область, г. Пущино, ул. Институтская, д. 4, 142290

ПОДПИСЬ
УДОСТОВЕРЯЮ
З. АВ. КАНЦЕЛЯРИИ
ИБ РАН
АКСЕНОВА Г. Н.
19.11.2024

