

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН), по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 04.12.2024 г. № 29  
о присуждении гражданину Российской Федерации **Дерябину Александру Сергеевичу** ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Роль белков RPF1 и ERF1 в процессинге пре-рРНК человека» по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология принята к защите 01.10.2024 г. (протокол заседания №18) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН) 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10 на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г., а также Приказа Минобрнауки России № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель, Дерябин Александр Сергеевич 23.12.1995 года рождения, в 2019 году окончил специалитет факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова» по специальности «Фармация». В период подготовки диссертационной работы с 2019 по 2024 гг. являлся аспирантом очной формы обучения ГНЦ ИБХ РАН по направлению Биологические науки. С 2019 г. по настоящее время работает младшим научным сотрудником лаборатории молекулярной онкологии отдела функционирования живых систем ГНЦ ИБХ РАН.

Диссертация выполнена в лаборатории молекулярной онкологии отдела функционирования живых систем ГНЦ ИБХ РАН.

Научный руководитель – доктор биологических наук Рубцов Юрий Петрович, главный научный сотрудник лаб. молекулярной вирусологии ГНЦ ИБХ РАН.

### **Официальные оппоненты:**

Малыгин Алексей Аркадьевич, доктор химических наук, доцент, заведующий лабораторией структуры и функции рибосом ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук;

Лябин Дмитрий Николаевич, доктор биологических наук, руководитель группы регуляции биосинтеза белка ФГБУН Института белка Российской академии наук дали **положительные** отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), г. Москва, в своем **положительном** отзыве, подписанном доктором биологических наук, ведущим научным сотрудником лаборатории регуляции внутриклеточного протеолиза Морозовым Алексеем Владимировичем и утвержденном заместителем директора, д.б.н., чл.-корр. РАН Митькевичем Владимиром Александровичем, указала, что диссертационная работа Дерябина Александра Сергеевича «Роль белков RPF1 и ESF1 в процессинге пре-рРНК человека», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 (молекулярная биология) по поставленным задачам, уровню их решения и научной новизне полученных результатов полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. No 842), а ее автор, Дерябин Александр Сергеевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. - Молекулярная биология.

Соискатель имеет 5 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 4 работы общим объемом 7,6 п.л. в рецензируемых научных изданиях из перечня, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы, в которые соискатель внес основной или существенный вклад:

1. Deryabin A., Moraleva A., Dobrochaeva K., Kovaleva D., Rubtsova M., Dontsova O., Rubtsov Y. Human RPF1 and ESF1 in Pre-rRNA Processing and the Assembly of Pre-Ribosomal Particles: A Functional Study. *Cells* 2024, 13, 326.

2. Moraleva A.\*, Deryabin A.\*, Kordyukova M.\*, Polzиков M., Shishova K., Dobrochaeva K., Rubtsov Y., Rubtsova M., Dontsova O., Zatsepina O. (2023). Human nucleolar protein SURF6/RRP14 participates in early steps of pre-rRNA processing. *PloS one*, 18(7), e0285833. (\* - обозначает равный вклад авторов).

3. Moraleva A.A., Deryabin A.S., Rubtsov Y.P., Rubtsova M.P., Dontsova O.A. Eukaryotic Ribosome Biogenesis: The 60S Subunit. *Acta Naturae*. 2022 Apr-Jun;14(2):39-49.

4. Moraleva A.A., Deryabin A.S., Rubtsov Y.P., Rubtsova M.P., Dontsova O.A. Eukaryotic Ribosome Biogenesis: The 40S Subunit. *Acta Naturae*. 2022 Jan-Mar;14(1):14-30.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

**1. Отзыв официального оппонента д.х.н. Малыгина Алексея Аркадьевича.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания: **1.1.** В “Обзоре литературы” можно найти несколько неточностей. Например, на стр. 12 Р-сайт рибосомы определяется как

участок, в котором находится тРНК с растущей полипептидной цепью. Однако это определение не совсем корректно, поскольку после реакции транспептидации растущая полипептидная цепь оказывается на тРНК, находящейся в А-сайте, и только после этапа транслокации эта тРНК поступает в Р-сайт рибосомы. На стр. 26 длина 5'-ETS у дрожжей указывается равной ~700 нуклеотидов, что не соответствует приведённому выше (стр. 7) значению длины этого участка (~1000 н.) и вводит читателя в заблуждение. Также, хотелось бы видеть более развёрнутые подписи к рисункам 7-9. **1.2.** К недостаткам раздела “Материалы и методы” следует отнести употребление в качестве разделяющего знака в десятичных дробях запятой вместо точки. При перечислении состава буферных растворов её часто можно спутать с текстовой запятой, что неудобно. Кроме того, в этом разделе отсутствует информация о последовательностях, применявшихся в работе малых интерферирующих РНК, модификациях в них, а также о последовательностях олигодезоксирибонуклеотидов, использовавшихся при создании плазмидных конструкций и в количественной ПЦР. Кстати, вместо термина “ПЦР в реальном времени” в тексте было бы правильнее использовать термин “количественная ПЦР”. **1.3.** По материалам раздела “Результаты и их обсуждение” осталось неясным, почему оценка влияния нокдауна факторов биогенеза рибосом RPF1 и ESF1 на профиль полисом (стр. 72) выполнялась только на стабильных клеточных линиях, а не на транзитивно-трансфицированных клетках, для которых была показана более высокая степень нокдауна целевых белков? **1.4.** Имеется ряд замечаний к рисункам 19 и 22. Во-первых, форма представления большого массива данных в чёрно-белом варианте воспринимается плохо. Во-вторых, из текста не понятно, почему приведены только обчисленные данные, а не непосредственный результат? В-третьих, были ли указанные “независимые эксперименты” биологическими или техническими повторами? Также непонятно, что автор имеет в виду под словосочетанием “транскрипт белка” в подписи к рис. 11?

**2.** Отзыв официального оппонента д.б.н. **Лябина Дмитрия Николаевича.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания: **2.1.** 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 важен и для биогенеза и, конечно, для функционирования рибосом. **2.2.** 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. **2.3.** К экспериментам по нокдауну 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. **2.4.** По разделу 3.2. так и не сделан вывод о роли NPM1 в

наблюдаемых эффекты, хотя в начале этого раздела, казалось, это подразумевалось. Как мне кажется, не четко сделан вывод о том, что всё произошло при нокдауне 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. **2.5.** 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? **2.6.** 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. **2.7.** В чем различие верхней и нижней панелей на рисунке 14 А и Б из текста диссертации и подписи не вполне ясно. **2.8.** На рисунках 19-23 хорошо было бы привести уровни статистической значимости наблюдаемых изменений.

**3. Отзыв ведущей организации.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания: **3.1.** В работе представлен достаточно полный обзор литературы. В тоже время подписи к рисункам 1, 3, 7 недостаточно детализированы. Кроме того, если изображения на рисунках (напр. 1, 3, 7, 8, 9) не созданы автором работы, целесообразно указывать ссылку на первоисточник. **3.2.** Раздел «Введение» в результатах, посвященный белкам RPF1 и ESF1, выглядит несколько нелогичным при наличии разделов, посвященных этим белкам в литературном обзоре. Кроме того, в разделе «Введение» результатов выжимка из всех результатов работы также выглядит несколько не на своем месте. **3.3.** Не совсем

понятно почему для получения вирусных частиц использовали клетки HEK293, а не HEK293T. **3.4.** Очевидно, что нокдаун RPF1 и ERF1 приводит к снижению содержания белков в клетках. На рисунках 14, 15, 16, 17 данные белки практически не видны и поэтому не совсем понятно, на что указывают стрелки. Кроме того, изображения клеток слишком маленькие, что затрудняет анализ полученного результата. В этой связи, следовало бы увеличить яркость изображений и увеличить их размер. **3.5.** Учитывая различный эффект подавления экспрессии с помощью siRNA и shRNA, было бы интересно оценить период полужизни белков RPF1 и ERF1 в клетках. **3.6.** Целесообразно было бы дополнить целый ряд рисунков (например: 12, 18, 19, 22), указанием наличия статистической достоверности выявляемых различий. **3.7.** На рисунках, отражающих результаты Вестерн блоттинга, целесообразно указывать молекулярную массу выявляемых белков, а также указывать, антитела к какой изоформе актина были использованы. **3.8.** На Рис 24А (левая часть) не подписано, какие фракции градиента анализировали. **3.9.** Рисунок 23, шрифт по оси ординат следовало бы несколько увеличить. **3.10.** При описании ультрацентрифугирования лучше указывать количество g, а не количество оборотов ротора в минуту. **3.11.** Наконец, в тексте присутствуют не совсем понятные выражения, встречаются неточности и опечатки. Например, ДДТ вместо ДТТ.

**4.** Отзыв на автореферат д.х.н., чл.-корр. РАН, проф. Сергиева Петра Владимировича, и.о. директора НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: **4.1.** На странице 7 количество использованных siRNA указано в пикомолях. Абсолютные значения малоинформативны, если не указано количество клеток или объем среды. **4.2.** На рисунках 4-7 не указан масштаб, хотя линии для указания масштаба на некоторых панелях имеются. **4.3.** На странице 19 приведен анализ градиентов концентрации сахарозы, с помощью которого делается вывод о соосаждении факторов RPF1 и ERF1 с предшественниками рибосомных субчастиц. Для усиления этого вывода было бы хорошо в качестве отрицательного контроля показать аналогичный анализ для цитоплазматической фракции (функциональных рибосом). **4.4.** На рисунке 15 показана схема биогенеза рибосом человека и это суммирующий рисунок, подводящий итог всей работы. Вот бы сюда вставить Вашу модель того, где работают факторы RPF1 и ERF1! **4.5.** Несколько обескураживает то, что относительные количества различных интермедиатов процессинга рРНК отличаются, причем иногда в разны стороны, в зависимости от используемого метода подавления экспрессии RPF1. Это поднимает вопрос о том, какому же из этих наборов данных верить? И не являются ли данные отклонения случайностью?

5. Отзыв на автореферат **к.б.н. Столбоушкиной Елены Александровны**, с.н.с. лаборатории структурных исследований аппарата трансляции Института белка Российской академии наук. Отзыв положительный, замечаний не содержит. Автор отзыва просит соискателя прокомментировать один из результатов: Нокдаун белков RPF1 и ERF1 приводил к пониженной жизнеспособности клеток почек эмбриона человека (HEK293) и к нарушениям процессинга пре-рибосомной РНК. Кроме того, происходило перемещение в нуклеоплазму одного из белков-маркеров ядрышка — структурного белка NPM1/B23. При этом морфология клеток и архитектура ядрышка при нокдауне белков RPF1 и ERF1 не менялась. Второй белок-маркер ядрышка — SURF6 сохранял свою локализацию в гранулярном компоненте ядрышка. Чем автор данной работы может объяснить такой результат? Возможно ли, что при нокдауне RPF1 и ERF1 отсутствие миграции белка SURF6 из ядрышка в нуклеоплазму связано с его структурной организацией?

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их достижениями в областях науки, соответствующих тематике диссертации, в частности в области исследования структуры и функции рибосом, что подтверждается наличием у них большого количества публикаций в высокоцитируемых российских и зарубежных журналах по теме диссертации соискателя. Их высокая квалификация позволяет объективно оценить научное и практическое значение представленной диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований были получены новые биохимические данные о роли ранних факторов биогенеза большой и малой рибосомных субъединиц RPF1 и ERF1. В данной работе был использован shRNA/siRNA индуцированный нокдаун этих белков, с целью определения их роли в биогенезе рибосом человека. Полученные экспериментальные результаты позволили описать изменения в профиле прерибосомных РНК в клетках человека, а также конкретизировать этапы процессинга, которые в значительной степени зависят от RPF1 и ERF1. Помимо этого была показана прямая ассоциация данных белков с предшественниками рибосомных субъединиц, продемонстрированы изменение поведения некоторых ядрышковых белков вследствие нокдауна RPF1 и ERF1, изменение активности РНК полимеразы I при нокдауне RPF1, а также полисомные профили клеток с нокдауном данных факторов. Полученные данные расширяют понимание биогенеза рибосом в клетках высших эукариот, демонстрируют его пластичность и подчеркивают необходимость получения функциональной характеристики факторов биогенеза рибосом.

**Теоретическая значимость** исследования заключается в том, что полученные в ходе работы над диссертацией результаты расширяют знания о биогенезе рибосом высших эукариот, показывают гибкость путей биогенеза рибосом в зависимости от

состояния клетки и демонстрируют отличия клеточного ответа высших эукариот от дрожжей при недостатке факторов биогенеза RPF1 и ESF1.

**Значение** полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что понимание особенностей биогенеза рибосом высших эукариот позволит выявить отличия этого процесса в норме и при патологии, что приведет к поиску и валидации новых терапевтических мишеней для терапии опухолевых, а также ассоциированных с нарушениями в биогенезе рибосом заболеваний.

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Эксперименты выполнены с использованием объективно выбранных методов и оборудования, результаты описаны точно и подробно, а выводы соответствуют поставленным задачам.

Личный вклад соискателя состоит в планировании и проведении экспериментов, обработке и анализе результатов, а также подготовке публикаций по итогам работы. Все генно-инженерные процедуры, эксперименты по получению стабильных клеточных линий, экспрессирующих shRNA против белков RPF1 и ESF1, работе с РНК и нозерн блоттингу, сахарозным градиентам были проведены диссертантом лично. Совместно с коллегами по лаборатории были проведены эксперименты по вестерн блоттингу, иммуоцитохимии и конфокальной микроскопии.

Диссертационный совет 21.1.037.01 заключил, что диссертационная работа Дерябина Александра Сергеевича является законченной научно-квалификационной работой, которая расширяет знания о биогенезе рибосом и, в частности, об участии ранних факторов RPF1 и ESF1 в созревании большой и малой субъединиц рибосом соответственно, и вносит существенный вклад в развитие молекулярной биологии и медицины. Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты и по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология». Таким образом диссертационная работа Дерябина Александра Сергеевича «Роль белков RPF1 и ESF1 в процессинге пре-рРНК человека», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология», соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации 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; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101; 25.01.2024 №62).

В ходе защиты диссертации соискателю Дерябину А.С. критических замечаний и вопросов задано не было.

