

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ГНЦ ИБХ РАН
4 декабря 2024 года

Защита диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Дерябин Александр Сергеевич

Тема: Роль белков RPF1 и ERF1 в процессинге пре-рРНК человека

Специальность 1.5.3 – “Молекулярная биология”

Москва – 2024

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 4 декабря 2024 года.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 5.

1. Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
2. Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
3. Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(1.4.9)
4. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
5. Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
6. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.4.9)
7. Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(1.5.6)
8. Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
9. Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(1.4.9)
10. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
11. Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(1.4.9)
12. Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
13. Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
14. Член-корр. РАН, д.х.н.	Мирошников Константин Анатольевич	(1.5.6)
15. Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
16. Д.б.н.	Рубцов Юрий Петрович	(1.5.3)
17. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
18. Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
19. Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
20. Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Мирошников А.И.: Итак, коллеги, защита - Дерябин Александр Сергеевич, «Роль белков RPF1 и ESF1 в процессинге пре-рРНК человека», научный руководитель - Рубцов Юрий Петрович, лаборатория молекулярной онкологии. Пожалуйста, слово Владимиру Александровичу.

Олейников В.А.: Материалы личного дела. Дерябин Александр Сергеевич, Российская Федерация, окончил факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова по специальности «Фармация» в 2019 году. С 2019 по 2024 года - аспирант нашего института, ГНЦ ИБХ РАН, с 2019 года по настоящее время – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии отдела функционирования живых систем ГНЦ ИБХ РАН. Кандидатский экзамен по специальности «Молекулярная биология» - «отлично». Работа выполнена в лаборатории молекулярной онкологии, руководитель диссертационной работы – доктор биологических наук Юрий Петрович Рубцов. По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите, автореферат диссертации размещены на сайте ВАК 1 октября 2024 года, т.е. вовремя. Все необходимые документы в деле имеются.

Мирошников А.И.: Пожалуйста, Александр Сергеевич.

Дерябин А.С.:

(Излагает основные положения диссертационной работы)

Мирошников А.И.: Спасибо. Вопросы? Не вижу. Спасибо. Юрий Петрович, пожалуйста, вам слово.

Рубцов Ю.П.: Добрый день. Значит, что я хотел бы сказать. На самом деле, получилось так, что Саша пришел в лабораторию не очень серьезно подготовленным в плане молекулярно-биологических, биохимических и других экспериментов. Но, что делает ему огромную честь, за время работы над этим проектом, который является, безусловно, сложным (можно видеть, что речь идет о анализе сложных рибонуклеопротеидных комплексов, которые не просто выделить, не просто охарактеризовать), он проявил огромное терпение, трудолюбие и, в общем-то, провел существенную работу над ошибками, которая позволила ему с достаточно большой успешностью решить поставленные перед ним задачи и добиться впечатляющих результатов. Особенно заметен рост в научном плане за последние два-три года. И в настоящее время я могу с гордостью сказать, что под руководством академика Донцовой, моим руководством, с помощью коллег мы имеем зрелого исследователя, который готов решать, в общем-то, широкий спектр научных задач не только связанных с биогенезом рибосом. И сейчас Саша вовлечен в проекты, которые мы совместно инициировали совместно с лабораторией Димы Андреева. Что я еще могу сказать, я чрезвычайно рад, что нам удалось такого прогресса, и я всячески поздравляю Сашу и высоко оцениваю его работу. Спасибо.

Мирошников А.И.: Спасибо. Владимир Александрович, пожалуйста.

Олейников В.А.: *(Зачитывает положительное Заключение организации, где выполнена диссертация).* Организация, где выполнялась работа — это наш институт, ГНЦ ИБХ РАН. У меня в руках заключение по диссертации. Тема подтверждена на заседании ученого совета еще в 2019 году в декабре, затем была несколько изменена, и последняя редакция — это февраль, 28 февраля 2024 года. Работа посвящена изучению биогенеза рибосом – сложного и упорядоченного внутриклеточного процесса, направленного на поддержание трансляционного потенциала клеток. Правильная сборка рибосомных субъединиц и их дальнейшая ассоциация является одним из ключевых процессов жизнедеятельности клеток. И, несмотря на значительные успехи, многие функциональные и структурные аспекты биогенеза рибосом высших эукариот, в частности человека, еще предстоит изучить. Таким образом изучение принципов сборки рибосомных субъединиц является крайне актуальной темой, интерес к которой будет сохраняться еще долгое время. Это определяет и новизну работы, и ее актуальность. Результаты опубликованы в 4 оригинальных статьях в хороших журналах. Сам Дерябин А.С. занимался планированием и проведением экспериментов, обработкой и анализом результатов, подготовкой публикаций, т.е. вклад его в эту работу несомненен. Диссертационная работа успешно прошла проверку на оригинальность и отсутствие заимствований, представляет собой новую хорошую научную квалификационную работу. Таким образом можно заключить, что диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к диссертационным работам и соответствует заявляемой научной специальности. На основании решения (по итогам обсуждения) семинара отдела функционирования живых систем принято заключение, что диссертация рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Подписано зав. отделом функционирования живых систем, доктором химических наук, академиком, профессором, Ольгой Анатольевной Донцовой. Подтверждено зам. директора ГНЦ ИБХ РАН Ямпольским И.В. и утверждено директором нашего института, академиком, Александром Габибовичем Габибовым. Рекомендовано к защите.

Отзыв ведущей организации. *(Зачитывает отзыв ведущей организации, отзыв положительный).* В качестве ведущей организации выступил институт молекулярной биологии имени Энгельгардта Российской Академии наук. Отзыв полностью положительный, опять же начинается с актуальности темы, подчеркивается, что многие функциональные процесса сборки рибосом остаются к настоящему времени неизученными. Структура диссертации построена по классической традиционной схеме, 100 страниц, 211 источников, и все компоненты, все части присутствуют. Введение – краткое описание изучаемой темы, ее актуальность, цели, задачи данной работы. Обзор литературы все необходимые для понимания работы сведения, демонстрирует высокий уровень диссертанта в понимании изучаемой проблемы. Далее, материалы и методы – детально описаны все использованные в работе методики, включая современные молекулярно-биологические подходы. Результаты и обсуждения включают 7 подразделов, посвященных описанию основных результатов. На основании результатов автором сделаны 5 выводов, которые полностью соответствуют поставленным задачам. Научная новизна – представлены новые данные о роли белков RPF1 и ERF1 в биогенезе рибосом в клетках человека. Полученные результаты убедительно демонстрируют

количественные изменения содержания прерибосомных РНК в клетках человека при подавлении экспрессии как белка RPF1, так и белка ESF1. Полученные результаты не только дополняют уже имеющиеся данные по биогенезу рибосом высших эукариот, но и показывают гибкость путей биогенеза рибосом в зависимости от состояния клетки. Практическая значимость: результаты имеют значение для понимания фундаментальных процессов организации синтеза белка в клетке, в то же время они имеют практическую ценность. Так, известно, что клетки новообразований в виду повышенной метаболической активности крайне зависят от эффективно работы рибосом и быстрого синтеза, таким образом предполагается, что определенный тип раковых клеток более зависим от корректного биогенеза рибосом, чем нетрансформированные клетки, что в свою очередь может быть использовано при разработке новых лекарственных препаратов. Апробация диссертации: описано, что работа опубликована в 4 статьях. В целом, диссертационное исследование изложено последовательно, целостно, результаты являются оригинальными и отражают как новизну данной работы, так и проявленное диссертантом высокое экспериментальное мастерство. Однако есть ряд замечаний и вопросов.

Первое, в работе представлен достаточно полный обзор литературы, в то же время подписи к рисункам 1, 3, 7 недостаточно детализированы. Кроме того, если изображения на рисунках 1, 3, 7, 8 и 9 не созданы автором работы, целесообразно указывать ссылку на первоисточник. Второе, раздел введение в результатах, посвященных белкам RPF1 и ESF1, выглядит несколько нелогичным при наличии разделов с подробной характеристикой этих белков в литературном обзоре. Кроме того, выжимка из всех результатов работы в этом разделе также выглядит несколько не на своем месте. Не совсем понятно, почему для получения вирусных частиц использовали клетки HEK293, а не HEK293T. Очевидно, что нокаунт вот этих белков RPF1 и ESF1 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. Учитывая различный эффект подавления экспрессии с помощью siRNA и shRNA, было бы интересно оценить период полужизни белков RPF1 и ESF1 в клетках. Целесообразно было бы дополнить целый ряд рисунков, например, 12, 18, 19 и 22, указанием наличия статистической достоверности выявляемых различий. Седьмое: на рисунках, отражающих результаты вестерн-блоттинга, целесообразно указывать молекулярную массу выявляемых белков, а также указывать антитела к какой изоформе актина были использованы. Восьмое: на левой части рисунка 24A не подписано, какие фракции градиента анализировать. Девятое: рисунок 23, шрифт по оси ординат следовало бы увеличить. Десятое: при описании ультрацентрифугирования правильнее указывать количество g, а не количество оборотов ротора в минуту. Одиннадцатое, наконец, в тексте присутствуют не совсем понятные выражения, встречаются неточности и опечатки, например, DDT вместо DTT. Вышеупомянутые замечания ни в коей мере не снижают высокую научную практическую значимость работ. В целом, диссертационная работа Дерябина Александра Сергеевича является законченной научно-квалификационной работой.

Тема диссертационной работы соответствует пунктам 4, 5, 8 и 9 паспорта научной специальности 1.5.3 «Молекулярная биология». По поставленным задачам и уровню их решения, научной новизне полученных результатов данная работа полностью соответствует требованиям пункта 9 положения о присуждении ученых степеней со всеми ее дополнениями и приложениями, а автор Дерябин Александр Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.3 «Молекулярная биология».

Эта работа была рассмотрена на объединенном научном семинаре профильных лабораторий ИМБ РАН. Отзыв был подготовлен Морозовым Алексеем Владимировичем, ведущим научным сотрудником лабораторий регуляции внутриклеточного протеолиза Института молекулярной биологии имени Энгельгардта, и подписан, утверждён заместителем директора ИМБ РАН, член-корреспондентом Митькевичем В.А.

Мирошников А.И.: Спасибо. Пожалуйста, Александр Сергеевич, отвечайте.

Дерябин А.С.: Мы благодарим ведущую организацию за предоставленный отзыв, за повышенное внимание к деталям в этом отзыве. Я начну последовательно отвечать на комментарии, которые нам представили.

Что касается подписей к рисункам 1, 3, 7, я соглашусь с Алексеем Владимировичем Морозовым, что их стоило бы несколько расширить, но здесь возникает проблема (к сожалению, они не представлены в презентации, потому что находятся в обзоре литературы). Проблема такая, что биогенез рибосом – тема сложная и объемная, и рисунки, которые Алексей Владимирович указал здесь очень объемные. Соответственно их детальное описание и все комментарии есть в тексте, а дополнительно дублировать их в описании мы не стали для того, чтобы не увеличивать и не размывать внимание читателя. Ссылки на рисунки и оригинальные работы, с которых рисунки взяты, присутствуют в тексте.

Что касается следующего комментария по поводу не своего места участков текста, то объяснение связано с первым комментарием. Обзор литературы объемный и содержит большое количество деталей, без которых читателю достаточно сложно сформировать целостную картину, поэтому нами было принято решение было сделать очень краткое резюме в конце лит. обзора и, соответственно, сделать небольшое введение, чтобы подготовить читателя к ознакомлению с результатами, которые тоже достаточно объемные, чтобы произошла смена внимания.

Что касается клеток НЕК293Т, я признаю, это моя ошибка в процессе написания, у нас клетки генотипированы, они действительно содержат Т-антиген. Его исключительная роль в том, что он не позволяет размываться плазмидной ДНК, которой в клетке трансфицируется, там и титр повышается, ну и так далее, так далее. С Алексеем Владимировичем этот момент тоже был уточнен.

По поводу изображений (позволю себе к ним перейти) о которых идет речь в отзыве. В данном случае мы очень хорошо видим остаточную флуоресценцию. Стоит сказать, что по отношению к контролю она распределена более диффузно, поэтому сигнал в контроле

более яркий по сравнению с экспериментальными образцами. Во-вторых, мы сталкивались не раз с такой проблемой, что на разных экранах с разными проекторами такие картинки выглядят абсолютно по-разному. Важно отметить, что все изображения, которые получены в диссертации, сделаны при одних и тех же настройках микроскопа, чтобы показать наблюдаемые различия при одинаковых условиях.

По поводу различного эффекта siRNA и shRNA. Безусловно согласен, что было бы интересно посмотреть время полужизни белков. В случае shRNA стоит отметить, что нами получены стабильные линии, и единожды произошедший нокдаун будет поддерживаться в отобранных клетках на определенном уровне постоянно. В случае с siRNA по представленным ранее вестерн-блотам (нокдаун проходил в течение 3х дней) мы можем сказать, что время полужизни как минимум сильно меньше, чем трое суток.

По поводу масс и визуализации вестерн-блотов, конечно, соглашаюсь. По поводу вопросов к градиенту позволю себе перейти к картинке. Мы здесь видим, что у нас было получено 24 фракции градиента, на нозерн-блоте мы их все обозначили, соответственно, все ровно то же самое анализировалось и с помощью вестерн-блота. Внимание на вестерн-блоте мы сконцентрировали именно на тех фракциях, в которых мы видим искомые нами белки. Не выделена первая часть, но, безусловно, то же самое количество фракций было нами проанализировано, иначе это было бы бессмысленной работой.

С остальными комментариями по поводу некоторого количества опечаток мы, конечно, соглашаемся.

Мирошников А.И.: Спасибо. Отзыв на автореферат.

Олейников В.А.: В диссертационный совет поступило 2 отзыва на автореферат. Оба отзыва положительные, но совершенно не стандартные. *(Зачитывает первый отзыв)*. Первый отзыв подписан старшим научным сотрудником ИБ РАН (Институт Белка РАН) кандидатом биологических наук Столбоушкиной Еленой Александровной. В работе исследовалась роль двух белков в биогенезе рибосом человека. Показано, что белки входят в состав незрелых 60S и 40S рибосомных субчастиц соответственно. Нокдаун белков приводил к пониженной жизнеспособности клеток почек эмбриона человека и к нарушениям процессинга прерибосомной 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 ESF1 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 RPF11 и ESF11 отсутствие миграции белка SURF6 из ядрышка в нуклеоплазму связано с его структурной организацией? Подписано Столбоушкиной Еленой Александровной.

Сразу зачитываю второй отзыв. *(Зачитывает второй отзыв)*. Второй отзыв подписан доктором химических наук, член-корреспондентом РАН, Сергеевым Петром Владимировичем. Изучение биогенеза рибосом в клетках человека представляет существенный интерес как для фундаментальной, так и для прикладной биологической

науки. Как и любая интересная работа, диссертационная работа Александра Сергеевича Дерябина имеет некоторые недостатки, а также побуждает выразить пожелания к ее возможному продолжению. Начнем с мелких придирок. На странице 7 количество использованных siRNA указано в пикомолях. Абсолютные значения малоинформативны, если не указано количество клеток или объем среды. На рисунках 4 и 7 не указан масштаб, хотя линии для указания масштаба на некоторых панелях имеются. На странице 19 приведен анализ градиента в концентрации сахарозы, с помощью которого делается вывод о соосаждении фактором RPF1 и ERF1 с предшественниками рибосомных субчастиц. Для усиления этого вывода было бы хорошо в качестве отрицательного контроля указать аналогичный анализ для цитоплазматической фракции функциональных рибосом. На рисунке 15 показана схема биогенеза рибосом человека, это суммирующий рисунок, подводящий итог все работы. Вот бы сюда вставить вашу модель того, где работают факторы.

Теперь более серьезное замечание. Несколько обескураживает то, что относительное количества различных интермедиатов процессинга РНК отличаются, причём иногда в разные стороны, в зависимости от используемого метода подавления экспрессии RPF1. Это поднимает вопрос о том, к какому же из этих наборов данных верить. Не являются ли данные отклонения случайностью. Позволю себе заключить пожелания для дальнейшей работы. В подобных исследованиях самым правильным методом была бы иммунопреципитация комплексов с изучаемыми факторами. В выделяемых комплексах было бы славно определить белковый состав и состав фрагментов пре-рРНК. Это выделение также могло бы дать возможность в рамках сотрудничества с другими лабораториями определить пространственную структуру интермедиатов сборки.

Отмеченные недостатки, конечно же, не имеют принципиального характера. Работа опубликована в хороших журналах, в целом работа Дерябина Александра Сергеевича соответствует критериям ВАК, а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук. Повторяю, подписано членом-корреспондентом РАН Сергиевым Петром Владимировичем.

Мирошников А.И.: Отвечайте, Александр Сергеевич.

Дерябин А.С.: Благодарю обоих ревьюеров автореферата, особенно Петра Владимировича за его чуткость и комментарии, которые он дал. Что касается первого отзыва на автореферат, позволю себе перейти к изображениям. Мы видим как раз то, что белок SURF6 как маркер гранулярного компонента, находясь там вместе с белком NPM1, не выходит из ядрышка в нуклеоплазму. Я бы предположил, что это может быть связано с тем, что не так ярко выражен ядрышковый стресс. Здесь стоит понимать, что выход NPM1 связан может быть с абсолютно разными факторами, потому что этот белок выполняет огромное количество функций в ядрышке. И на самом деле четко детерминировать, почему в одном случае происходит так, а в другом - по-другому, очень сложно. Помимо этого, стоит сказать, что может быть функционал белков, исследуемых нами от RPF1 и ERF1, ближе ассоциирован с NPM1, и какие-то нарушения, которые мы вызываем при нокадауне этих белков, могут проявляться как раз тем, что NPM1 выходит, а SURF6,

лежащий на какой-либо другой оси биогенеза или, например, в других процессах, сохраняет свое положение. Важно отметить, что вот такое сравнение двух белков из одного компонента ядрышка говорит о том, что его ультраструктура не нарушается. И тот стресс, который мы видим, это скорее стресс биогенеза, нежели стресс ядрышка.

Что касается ответов на комментарии Петра Владимировича Сергиева. Соглашусь, что пикомоли малоинформативны, но стоит отметить, что в материалах и методах четко описаны все процессы трансфекции, какие планшеты мы использовали, какие лунки, какие объемы среды мы использовали. Отмечу, что это 15-наномолярные концентрации для данных дуплексов.

Что касается размеров изображений, согласен, что мы могли бы привести масштабы для большей наглядности. Для дополнения картинки 15, о которой упомянул Петр Владимирович, то, конечно, стоило бы добавить для большей информативности ввиду того, что описываемые процессы достаточно сложные.

Что касается эффектов, которые мы наблюдаем в случае нокдауна RPF1 с помощью shRNA и siRNA, мы видим их действительно несколькими отличающимися. Здесь стоит сказать, что, строго говоря, эти два метода нокдауна очень разные. То есть нокдаун с помощью малых шпилечных РНК всё-таки кажется более нативным с точки зрения образования активных дуплексов в клетке, потому что здесь происходит интеграция последовательности, которая кодирует эти шпильки в геном, и, соответственно, происходит нативный процессинг с использованием всей машинерии клетки. А в случае нокдауна с помощью siRNA мы добавляем дуплексы к клеткам, и они попадают непосредственно в цитоплазму. Это не самый физиологический процесс - нахождения двуцепочечной РНК в цитоплазме клеток. Поэтому вполне возможно, что такие отличия, которые мы наблюдаем, могут быть связаны с такими принципиальными отличиями двух подходов. Стоит отметить что очень важным является характеристика изменений в одной оси, полученных обоими методами нокдауна. Они дают небольшие изменения фенотипические, но не дают изменения принципиальные. Мы попадаем на одну и ту же ось, сопряженную с биогенезом большой субъединицы и определенного сайта процессинга.

Ну, в общем-то, всё, что я могу сказать, потому что это был последний комментарий.

Мирошников А.И.: Спасибо. Официальный оппонент Дмитрий Николаевич Лябин, доктор биологических наук из Института Белка.

Лябин Д.Н.: *(Излагает отзыв. Отзыв положительный).* Здравствуйте, глубокоуважаемые коллеги. Когда я беру диссертацию, первое, что я делаю – смотрю на количество страниц. В данном случае страниц было 100, и я сразу подумал, что автор стремится, наверно, к совершенству. Как оказалось впоследствии, работа оказалась классической кандидатской диссертацией, в которой нет ничего лишнего, четко поставлены цели, задачи, не «напихано» никаких дополнительных результатов, в которых участвовал диссертант дополнительно, как это часто бывает. Это первое, что я хотел отметить. А второе — это актуальность, конечно. Тема биогенеза рибосом очень

сложная, должен сказать, что это скоординированное в пространстве и во времени событие, в котором участвуют сотни, если не тысячи, белков. Плюс к этому малые ядрышковые и малые ядерные РНК. Поэтому этот процесс имеет большое отношение не только к изучению природы синтеза белка, но и потенциально может иметь прикладное значение, поскольку регуляция этого процесса может быть важна для разработки различного рода препаратов для контроля за экспрессией генов. Важно понимать, что некоторые рибосомопатии обусловлены белками, которые участвуют в биогенезе рибосом.

Что касается самой работы, манускрипта, то она построена по классическим лекалам, все необходимые разделы присутствуют. Начну по пунктам. Замечательное введение. В качестве претензии ведущей организации было высказано, что повторяется то, что будет в литературном обзоре, но в данном случае мне это, наоборот, понравилось (имеется в виду небольшое сжатое резюме о белках RPF1 и ESF1). Обзор литературы в основном посвящен в большей части процессингу пре-рРНК. В этом разделе меня несколько удивило, что слабо или недостаточно описывается участие рибосомных белков в биогенезе рибосом: когда они появляются, как они взаимодействуют. Они тоже влияют на формирование рибосом. В обзоре литературы чуть меньше уделено внимания белкам RPF1 и ESF1. Здесь все нормально, хорошо описывается функциональное значение этих белков, но мне, пожалуй, не хватило описания структурных особенностей этих белков. Если не известно о этих белках в высших эукариотах, то, может быть, о дрожжевых белках известно чуть больше, и это можно было бы упомянуть. По разделу материалы и методы претензий нет, все соответствует поставленным задачам.

Результаты: здесь подкупает то, что каждый раздел претворяется кратким описанием того, что будет сделано, зачем будет сделано, т.е. позволяет понять всю логику работы. Но не всегда в конце будет сделать вывод.

Перейду к замечаниям. Первое замечание уже прозвучало. Это различие между эффектами от выключения белка RPF1 с помощью siRNA и shRNA. Это относится к экспериментам по процессингу пре-рРНК, о чем уже Петр Владимирович говорил, это связано с экспериментами по наблюдению за профилем полисом. Может быть, если бы выключили RPF1 сильнее, то эффект на количество 60S субъединицы или полисом был бы более наглядным или появился бы вообще. Второе, что связано с выключением белков, мы замечаем, что при выключении RPF1 и ESF1 они меняют свою локализацию. Возникает вопрос, существует ли некая критическая концентрация для их локализации в ядрышках. Если белка мало, то он распределен диффузно, а если повышается количество, то он переходит в ядрышко непосредственно. И связанный с этим вопрос о причинах выхода NPM1 в нуклеоплазму. Возникает вопрос, взаимодействуют ли эти белки, утягивает ли он их с собой или нет. Раздел 3.2 начинается с размышления о том, что уменьшилось количество NPM1 в ядрышках при выключении белков RPF1 и ESF1 и вероятные эффекты могут быть связаны с изменением локализации этого белка и влиянием на транскрипцию рРНК, но в конце раздела уже про то какова же была роль NPM1 в эффектах, наблюдаемых при нокауте RPF1 и ESF1. Кроме того, не вполне четко звучит вывод о том, что произошло при удалении RPF1 и ESF1. Нарушен процессинг,

поэтому накапливается непротранслированная РНК, или произошло возрастание синтеза рибосомной РНК, и она просто не успевает протранслироваться.

Про полисомные профили. У меня нет никаких сомнений, что эти белки ко-седиментируют с 28S и 18S рРНК предшественниками, но на полисомном профиле, который представлен в диссертации видно, что пики, где локализуется белок и рРНК, не совсем совпадают с пиками оптической плотности, которые можно видеть на полисомной профиле. Хотелось бы услышать объяснение, чему соответствуют эти пики и почему они не являются мажорными по сравнению с теми пиками, где локализуется рибосомная РНК и белки RPF1 и ERF1. Что касается опять же профиля полисом для оценки влияния RPF1 и ERF1 на трансляцию. Вы говорите, что выключили белок, полисомы не изменились, значит трансляция не изменилась. Строго говоря, это не всегда так, поэтому убедительнее было бы произвести метаболическое мечение с помощью S^{35} -метионина или азидогомоаланина, и, поскольку вы владеете методами клик-реакций, вы могли бы потом детектировать включение азидогомоаланина в клеточные белки и оценить трансляцию, синтез белка при нокдауне ERF1 и RPF1. Наконец вопрос про РНК связывающую способность этих белков. Где-то в обзоре литературы очень кратко одним предложением написано, что, вроде бы, в старых работах это было показано, может быть с тех времен что-то изменилось, может быть есть данные в базе ENCODE, по данным eCLIP может быть что-то известно, с какими РНК они взаимодействуют и в каком месте. Собственно говоря, к этому тоже относится, важно ли связывание с РНК для функции RPF1 и ERF1 в клетке. Или мы можем удалить предполагаемые РНК связывающие мотивы, и эффект будет тот же самый, как и при удалении этих белков. И опять же, возвращаясь к siRNA и шпилечным РНК, совсем красиво было бы провести эксперименты, когда вы после выключения белков дополнительно синтезировали бы с плазмиды белок и посмотрели бы, что процессинг восстановился. Это, пожалуй, все мои замечания, остальные уже прозвучали. Я должен сказать, что мои замечания скорее придирки и хотелось бы отметить, что работа все равно выполнена на высоком уровне, это хорошая добротная именно кандидатская диссертация. Она по своей теоретической и практической значимости полностью соответствует требованиям и критериям, установленным положением о присуждении ученых степеней с многочисленными изменениями, а сам диссертант заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология. Спасибо.

Мирошников А.И.: Спасибо, Дмитрий Николаевич. Пожалуйста, Саша.

Дерябин А.С.: Дмитрий Николаевич, большое спасибо за такое внимание к деталям, очень интересные, важные комментарии, было очень приятно ознакомиться с вашим отзывом и готовиться к ответам на ваши комментарии. Позволю себе начать с конца. Прозвучало два комментария по поводу структуры и вообще изученности данных белков и возможности связывать РНК и т.д. Здесь стоит отметить, что по каждому из белков, по RPF1 точно, существует одна единственная работа на дрожжах, достаточно старая, и больше работ не было сделано. По ERF1, на самом деле, чисто биогенезная работа тоже единственная, но есть вторая, в которой авторы пытались показать связь с нарушениями в развитии рыбок *Danio rerio*. Больше работ не было. Что касается ERF1 можно ответить

довольно быстро, что у него есть несколько, так сказать, naturally unfolded доменов, но каких-то известных доменов, которые связаны с РНК, показано не было. Здесь напрашивается такой комментарий, как и во многих факторах биогенеза, так и в прочих белках такие неструктурированные домены свою финальную конформацию получают тогда, когда взаимодействуют с нужными партнерами, возможно, в данном случае такой эффект тоже есть. Что касается белка RPF1, действительно в нем есть домен Vrix, его очень часто ассоциируют с sigma70 доменом прокариот. Известно, что sigma70 домен является доменом транскрипционных факторов прокариот, поэтому у него есть ДНК связывающая активность. В литературе особого внимания на этом домене и его влиянии на связывание, необходимости и возможности промутировать, чтобы убрать связывание, уделено не было. Поэтому в данном случае сказать сложно, поэтому это скорее повод сделать интересные эксперименты по получению мутантных белков и на эти вопросы таким образом ответить.

Перейду к ответам по порядку. Что касается Вашего комментария по поводу присоединения рибосомных белков, это, безусловно, не менее важная история, чем присоединение факторов биогенеза рибосом. Конечно, с нашей стороны стоило хотя бы кратко эту историю показать, мы не стали включать, чтобы достичь скомпанованность работы и не увеличивать объем этой работы. По поводу восстановления функции белков при нокадауне. Конечно, это тоже интересные эксперименты, чтобы сделать экзогенную экспрессию. При этом существует интересный момент, который тоже нуждается в оценке. Экзогенная экспрессия, которая может привести к сверхэкспрессии (зависит от промотора), может привести к негативным результатам для клеток. В нашей лаборатории был такой опыт с белком Surf6, и нокадаун, и оверэкспрессия которого не самым положительным образом сказываются на метаболизме клеток. Несмотря на это, этот эксперимент был бы интересен.

Очень интересен ваш комментарий по поводу критической концентрации данных белков. На самом деле сказать сложно вследствие недостатка информации, да и что касается других факторов биогенеза, которые изучались в других статьях, таких вопросов даже не поднималось. Очень часто подобные изображения (конфокальные снимки) показывают, показывают эффекты на разные ядрышковые белки, переходы из одного компонента ядрышка в другой, в нуклеоплазму и вообще накопление в цитоплазме. В общем, таким вопросом не интересовались, возможно в этом есть смысл и это играет важную роль в функционировании клеток, формировании правильной архитектуры ядрышка и в целом правильном процессинге рРНК.

По поводу Вашего комментария о роли NPM1 и о вопросе, который мы подняли, когда оценивали (позвольте вернуться к слайду) в данном эксперименте (по содержанию 5' ETS предшественника). Большой акцент был сделан на сам факт, что выход NPM1 очень часто может быть связан с разными стрессовыми факторами, и в литературе приводят как раз ассоциацию между выходом NPM1 и понижением активности РНК полимеразы 1-го типа. И первичной целью для нас была необходимость оценить, а есть ли в данном случае такая связь у нас. И как я ранее говорил, конечно, хотелось бы сделать вывод о том, какая здесь принципиальная роль NPM1, но я боюсь, что это на данном этапе,

скорее, очень сложно, потому что действительно функций у него огромное количество, и мы не забываем, что это еще очень важный структурный компонент ядрышка. Поэтому то, что является первоочередной причиной, выявить сложно.

По поводу градиента, позволю себе перейти к картинке с дополнительного слайда, чтобы все понимали, о чем идет речь. Действительно, у нас есть профиль зависимости оптической плотности при 260 нм от времени, и, соответственно, он был фракционирован, и эти картинки с нозерн и вестерн блотами я уже показывал на слайде. Здесь важно отметить, что мы снимали исключительно при длине волны 260 нм, а все-таки профиль при 280 нм может отличаться, и пики могут быть несколько сдвинуты. Вторым моментом, который важно отметить, что это ядрышковая фракция, она, очень сильно отличается по своему составу и по профилям от привычной всем цитоплазматической фракции, когда мы видим выраженные пики. В ядрышке обычно очень большое количество предшественников рибосом на разных стадиях процессинга, поэтому можно предположить, что такие пики являются причиной размазывания таких предшественников в градиенте плотности сахарозы, поэтому мы можем получать более сглаженную картину. В любом случае важным фактом, который мы из этого эксперимента получили, является соосаждение с предшественниками большой и малой субъединицы для каждого из белков соответственно.

По поводу вашего следующего комментария про полисомы и мечение белков. Большое спасибо, мы подготовились к ответу, сделали эксперименты. Мы использовали гомопротаргилглицин – это аналог метионина с алкильной связью, и использовали краситель Су3, который конъюгировали с гомопротаргилглицином. Этот слайд вводный. Сверху мы можем видеть интактные клетки НЕК293 и то, как они светят в канале PE (тот канал, в котором будет светить Су3). Мы видим, небольшое эндогенное свечение. Нашей задачей в дальнейшем был подбор необходимого контроля для того, чтобы понимать, что у нас синтез белка заингибирован. Мы использовали циклогексимид и инкубировали клетки в течение с циклогексимидом. Стоит сказать, что на первом этапе клетки инкубируются в среде без метионина для того, чтобы истощить клеточный запас метионина. Мы это делали в течение часа, а далее, в течение следующего часа, клетки инкубировались в присутствии гомопротаргилглицина и циклогексимида. Мы видим в контроле эндогенное свечение клеток НЕК293, видим флуоресценцию Су3 в клетках, необработанных циклогексимидом, и видим достаточно явный сдвиг пика флуоресценции Су3 при обработке клеток циклогексимидом. Это говорит о том, что у нас контроль работает и трансляция в данном случае достаточно снижена. Также видим, что клетки, которые обработаны циклогексимидом, окрашиваются значительно слабее, чем клетки, которые не обработаны им. Далее нами был сделан эксперимент с нашими клеточными линиями, мы использовали по одной линии с нокдауном RPF1 и ESF1. Мы видим существенный сдвиг флуоресценции, т.е. клетки окрашиваются достаточно хорошо с помощью Су3, при этом пики накладываются на контрольные клетки, которые инкубировались с гомопротаргилглицином. Это говорит о том, что уровень трансляции в наших клеточных линиях действительно не снижен значимо. Мы обсчитали все данные цитометрии: инкубирование в течение часа с циклогексимидом практически в 10 раз

снижает уровень трансляции, а в наших клеточных линиях не наблюдается статистически значимых различий в сравнении с контролем. Мы можем сказать, что уровень трансляции на уровне обычных нетрансформированных клеток.

По поводу вашего комментария и экспериментов по профилю рибосомных субъединиц и нокадауна RPF1 с помощью siRNA, мы тоже сделали эксперименты. Хотели бы показать графики, они несколько нас заинтересовали. Мы видим нокадаун в течение трех дней и нокадаун в течение 6 дней двукратный, т.е. на третий день инкубации мы делали повторную трансфекцию. Мы видим, что RPF1 практически отсутствует, поэтому можно смело заявлять, что у нас эффективность нокадауна не менее 95%. Интересные результаты, которые не так просто объяснить: мы видим, что пик 60S+80S падает при нокадауне как однократном, так и двукратном. При этом мы наблюдаем, что пик 40S значительно растет как при однократном нокадауне, так и при двукратном. Возможно это связано с сборкой транслирующихся 80S, в общем это повод продолжить уделять внимание этому белку и эффектам, которые он оказывает.

По поводу выделения прерибосомных комплексов, абсолютно согласен, что было бы интересно их выделить. У нас мысли такие есть, достаточно серьезный камень преткновения – выделение ядрышковых фракций и преципитация из этих фракции. В настоящее время у нас в лаборатории ведутся работы на эту тему, мы пытаемся за тегированные белки выделять комплексы, надеюсь, что это будет успешно. Спасибо.

Мирошников А.И.: Спасибо. Второй оппонент у нас отсутствует. Малыгин Алексей Аркадьевич, доктор химических наук, доцент, заведующий лабораторией структуры и функции рибосом Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Олейников В.А.: *(Зачитывает отзыв. Отзыв положительный).* Хочу сказать, что отзыв полностью положительный, отмечают те моменты, о которых мы уже все слышали, достижения. Отдельным разделом идут замечания по диссертационной работе. Замечания по диссертационной работе: работа на высочайшем уровне, получены значимые результаты, но имеется ряд вопросов и замечаний по тексту. 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, т.к. после реакции транспептидации растущая полипептидная цепь оказывается на тРНК, находящейся на А сайте, и только после этого этапа транслокации эта тРНК поступает на Р сайт рибосомы. На стр. 26 длина 5' ETS дрожжей указывается равно 500 нуклеотидов, что не соответствует приведенному выше на стр. 7 значению длины этого участка в 1000 нуклеотидов, и вводит читателя в заблуждение. Также хотелось бы видеть более развернутые подписи к рисункам 7 и 9. К недостаткам раздела материалы и методы следует отнести употребление в качестве разделяющего знака десятичных дробей запятой вместо точки. При перечислении составов буферных растворов их часто можно спутать с текстовой запятой, что неудобно. Кроме того, в этом разделе отсутствует информации о последовательностях, применяющихся в работе малых интерферирующих РНК,

модификациях в них, а также последовательностях олигодезоксирибонуклеотидах, использовавшихся при создании плазмидных конструкций и в количественной ПЦР. Вместо термина ПЦР в реальном времени в тексте было бы правильнее использовать термин количественная ПЦР. По разделу результаты и обсуждения осталось неясным, почему оценка влияния нокдаун факторов биогенеза рибосом RPF1 и ESF1 на профиль полисом выполнялась только на стабильных клеточных линиях, а не на транзитно трансформированных клетках, для которых была показана более высокая степень нокдаун целевых белков. Имеется ряд замечаний к рисункам 19 и 22. Во-первых, форма представления большого массива данных в черно-белом варианте воспринимается плохо. Во-вторых, из текста непонятно, почему приведены только обчисленные данные, а не непосредственный результат. В-третьих, были ли указанные эксперименты именно биологическими или техническими проворотностями. Также непонятно, что автор имеет в виду под словосочетанием транскрипт белка в подписи к рисунку 11. Что касается выводов, то они достаточно обоснованы и подтверждены результатами экспериментов автора, но, на мой взгляд, было бы более строгим дополнить описательную часть выводы 3 «наблюдается снижение содержания...» резюмирующей фразой, например, «что указывает на его роль в созревании 18S прерибосомной РНК». Недостатки не имеют принципиального значения. Автореферат полностью соответствует содержанию, в целом работа соответствует всем критериям ВАК, положению о присуждении степеней, а сам автор заслуживает присуждения искомой степени. Официальный оппонент, Малыгин Алексей Аркадьевич, зав. лабораторией структуры и функции рибосом Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Мирошников А.И.: Спасибо. Давайте, отвечайте, Александр Сергеевич.

Дерябин А.С.: Здесь можно отвечать уже кратко, потому что многие вопросы уже были озвучены. Безусловно, благодарю Алексея Аркадьевича за все комментарии. Что касается первого комментария по поводу тРНК и терминологии. Да, формулировка, которую дает Алексей Аркадьевич, более правильная, но здесь стоит сказать, что все зависит от ацилирования тРНК, которая находится в сайте. Если у нас в А сайте тРНК аминокислот ацилирована, то в Р сайте она уже деацилирована. По поводу несколько отличающейся длины 5' ETS участка я согласен, этой мой недосмотр, потому что в разных статьях бывает по-разному, соответственно, этот момент был упущен. По поводу более развернутых подписей комментариев уже был, что нам было принято решения не утяжелять их дополнительной информацией. По поводу вопроса, почему профиль полисом был сделан только на стабильных клеточных линиях. По логике нашей работы мы принимали решение на основании эффектов, наблюдаемых на нозерн блоте, и они, конечно, значительно более сильные в стабильных линиях. Что касается комментария по поводу того, что у нас не было приведено исходных данных. На самом деле я позволю себе не согласиться. Исходные данные – это изображения нозерн блотов. Далее они обчислялись. Обчисленная интенсивность каждого сигнала – это второй пул данных, о которых Алексей Аркадьевич как раз говорит (представлены в тексте диссертации). И третий пул данных – это сам RAMP анализ. На самом деле все данные, которые нужны

для обработки наших результатов были представлены. За остальные замечания и труд оппонента мы, конечно, благодарим. Спасибо.

Мирошников А.И.: Спасибо. Саша, подождите, пожалуйста, сейчас я спрошу, есть ли желающие выступить. Не вижу. Тогда говорите последнее слово.

Дерябин А.С.: Я, конечно, хочу еще раз поблагодарить моих руководителей. Особая благодарность Ольге Анатольевне. Без нее, без ее предложения присоединиться к коллективу, эта работа бы не состоялась, также не состоялся бы мой путь в молекулярной биологии. Поэтому очень благодарен Ольге Анатольевне. Интерес мой, я хотел сказать, что удовлетворен, но на самом деле он только разрастается в этой области и я был бы рад заниматься этим дальше. Спасибо всем коллегам.

Мирошников А.И.: Хорошо, спасибо. Коллеги, приступаем к голосованию.

(Проходит тайное голосование)

Олейников В.А.: Счетная комиссия закончила свою работу... Результаты подсчета голосов: Дерябин А.С. Присутствовало на заседании - 20, роздано - 20, оказалось в урне - 20, за - 20, против/недействительных - нет.

Мирошников А.И.: Еще вопрос по поводу заключения. Есть какие-нибудь замечания, предложения, нет? Тогда утверждаем. Кто за? Прошу голосовать, кто против. Единогласно. Поздравляем. Спасибо, заседание диссертационного совета окончено.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

