

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Дерябина Александра Сергеевича на тему: «Роль белков RPF1 и ESF1 в процессинге пре-рРНК человека» по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология»

Тема диссертации Дерябина А.С. связана с чрезвычайно «горячим» направлением современных исследований в области естественных наук – изучением принципов и деталей процесса сборки рибосомных субчастиц в клетках эукариот и прежде всего – человека. Рибосомы являются центральной молекулярной машиной клеточной белоксинтезирующей системы, и расстройства в работе этой системы отражаются на состоянии как клетки, так и всего организма, и поэтому такие расстройства часто служат причиной онкологических заболеваний. В настоящее время усилиями многих научных коллективов получены структурные данные, демонстрирующие архитектуру и последовательность сборки предшественников рибосомных субчастиц как у низших эукариот (на примере дрожжей), так и у человека. При этом для множества белков, входящих в состав пре-рибосомных субчастиц, до сих пор отсутствуют функциональные данные. Таким образом, изучение механизма биогенеза рибосомных субчастиц в целом и отдельного этапа этого процесса – роли белков RPF1 и ESF1 в процессинге пре-мРНК, чему посвящена работа Дерябина А.С., представляет актуальную задачу молекулярной биологии.

В ходе своего исследования диссертантом были получены новые данные о роли белков RPF1 и ESF1 в созревании рибосомных субчастиц человека. С использованием современных методов автор показал количественные изменения в составе различных форм пре-рРНК и различия в поведении некоторых ядрышковых белков при дефиците белков RPF1 и ESF1, обнаружил изменение активности РНК полимеразы I при нокдауне белка RPF1, а также установил локализацию белков RPF1 и ESF1 в составе пре-60S и пре-40S субчастиц соответственно. Эти данные дополняют и расширяют современные

знания и понимание биогенеза рибосом в клетках высших эукариот, а также показывают лабильность и тонкую регулировку этого процесса в зависимости от клеточных условий.

Диссертационная работа написана по традиционной схеме на 100 страницах, содержит 26 рисунков и включает следующие основные разделы: “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы” “Результаты и их обсуждение” и “Выводы”. Список литературы содержит 211 источников.

В разделе “Введение” в сжатом виде изложено общее состояние знаний в области исследований автора, кратко дана применяемая терминология, раскрыта актуальность работы, её цель и задачи, а также указана методология, использованная автором в работе. Здесь же даны положения, выносимые на защиту, приведена информация о количестве публикаций по материалам диссертации, об объёме и структуре работы.

В главе “Обзор литературы” автор знакомит читателя с современным научным взглядом на строение эукариотической рибосомы, процесс биогенеза рибосомных субчастиц, подробно описывает ход этого процесса, его участников и обращает внимание на сходства и различия данного процесса у высших и низших эукариот. Информация о ранних факторах биогенеза рибосом, RPF1 и ERF1, вынесена в отдельный подраздел, в котором на фоне известных данных об этих белках становится более понятной проблематика исследования автора. В целом, обзор достаточно информативен, хорошо иллюстрирован и помогает глубже проникнуть в суть изучаемых в диссертации вопросов.

Глава “Материалы и методы” содержит подробный список используемых реактивов и биопрепаратов, здесь же приведены составы буферных растворов и сред, а также указаны используемые в работе штаммы бактерий и линии клеток. Такая систематизация позволяет легко ориентироваться в необходимой информации. Описание применяемых автором методов и экспериментальных процедур дано достаточно подробно,

что при желании позволяет их легко воспроизвести или использовать в качестве лабораторного протокола.

В самой большой главе своей диссертации, “Результаты и их обсуждение”, автор приводит непосредственно описание полученных данных. В начале автор получает клетки с нокдауном белков RPF1 и ESF1 с помощью РНК-интерференции, используя два разных подхода: один – путём получения стабильной линии клеток, экспрессирующих shРНК против мРНК целевых белков, а второй – путём транзientной трансфекции соответствующими siРНК. После характеристики этих клеток автор с помощью конфокальной микроскопии исследует архитектуру ядрышек клеток и показывает, что нокдаун RPF1 и ESF1 не нарушает общую морфологию ядрышка, но изменяет внутриклеточную локализацию этих белков и индуцирует накопление белка нуклеофозмина в нуклеоплазме. Далее, с помощью внутриклеточного мечения 5-этинилуридином РНК в клетках с низким содержанием RPF1 и пониженной активностью РНК-полимеразы I и последующим выделением меченой РНК автор демонстрирует, что содержание раннего непротессированного короткоживущего предшественника 5'-ETS значительно повышено в клетках с нокдауном RPF1. Далее, используя нозерн-блот-гибридизацию, диссертант оценивает уровень специфических пре-рРНК в клетках RPF1 и ESF1 и показывает, что нокдаун RPF1 преимущественно приводит к изменению профиля пре-рРНК в биогенезе 60S субъединицы, а нокдаун ESF1 вызывает изменения в профиле предшественников 18S рРНК и ускорение пути биогенеза 2. Наконец, в заключительной части работы с помощью анализа фракций сахарозного градиента после разделения в нем ядрышковой фракции клеток HEK293 дикого типа автор показывает седиментацию белков RPF1 и ESF1 с предшественниками 60S и 40S субъединиц соответственно. Кроме того, диссертант установил, что нокдаун RPF1 и ESF1, несмотря на то, что они являются факторами биогенеза рибосом, не изменяет заметно профиль полисом в клетках. Важно отметить, что в конце главы диссертант подробно обсуждает свои результаты, сравнивая их с полученными другими авторами

данными о биогенезе рибосомных субчастиц и участию в нём факторов RPF1 и ESF1.

Раздел “Выводы” содержит 5 умозаключений автора, в которых он в лаконичной и конкретной форме обобщает новую информацию, полученную в ходе исследований, представленных в диссертации.

ЗАМЕЧАНИЯ ПО ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЕ. Хотя диссертационная работа Дерябина Александра Сергеевича выполнена на высочайшем научном уровне, и в ней получены значимые для профессионального научного сообщества результаты, а сама диссертация оформлена стройно и аккуратно, следует высказать ряд вопросов и замечаний по её содержанию и 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, 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.

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”.

По материалам раздела “Результаты и их обсуждение” осталось неясным, почему оценка влияния нокдауна факторов биогенеза рибосом RPF1 и ERF1 на профиль полисом (стр. 72) выполнялась только на стабильных клеточных линиях, а не на транзигентно-трансфицированных клетках, для которых была показана более высокая степень нокдауна целевых белков? 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?

Что касается выводов, то они достаточно обоснованы и подтверждены результатами экспериментов автора, но, на мой взгляд, было бы более строгим дополнить описательную часть вывода 3 “наблюдается снижение содержания...” резюмирующей фразой, например, “что указывает на его роль в созревании 18S рРНК”.

Отмеченные недостатки, конечно же, не имеют принципиального характера, никоим образом не отражаются на значимости и ценности диссертационной работы и не влияют на её основные результаты и выводы. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации, а результаты работы опубликованы в авторитетных изданиях. В целом, диссертационная работа Дерябина Александра Сергеевича 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; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант, Дерябин А.С., несомненно

