

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ИБХ РАН
6 декабря 2023 года

Защита диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук
Григорова Артема Сергеевича

По теме: **«Роль малых регуляторных РНК микобактерий в адаптации к стрессам»**

Специальность – 1.5.3. Молекулярная биология

Москва – 2023

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 6 декабря 2023 года.

Председатель

диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Мирошников Анатолий Иванович

Ученый секретарь

диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 6.

- | | | | |
|-----|------------------------|-----------------------------------|---------|
| 1. | Д.х.н., академик РАН | Мирошников Анатолий Иванович | (1.5.6) |
| 2. | Д.ф.-м.н. | Ефремов Роман Гербертович | (1.4.9) |
| 3. | Д.ф.-м.н. | Олейников Владимир Александрович | (1.5.6) |
| 4. | Д.б.н. | Ажикина Татьяна Леодоровна | (1.5.3) |
| 5. | Д.х.н. | Безуглов Владимир Виленович | (1.4.9) |
| 6. | Д.х.н. | Белогуров Алексей Анатольевич | (1.5.3) |
| 7. | Д.х.н. | Бовин Николай Владимирович | (1.5.6) |
| 8. | Д.х.н., академик РАН | Габибов Александр Габибович | (1.5.6) |
| 9. | Д.х.н. | Генералова Алла Николаевна | (1.5.6) |
| 10. | Д.х.н., академик РАН | Донцова Ольга Анатольевна | (1.5.3) |
| 11. | Д.б.н., член-корр. РАН | Завриев Сергей Кириакович | (1.5.6) |
| 12. | Д.б.н. | Зарайский Андрей Георгиевич | (1.5.3) |
| 13. | Д.б.н. | Лебедев Юрий Борисович | (1.5.3) |
| 14. | Д.х.н., чл.-корр. РАН | Мирошников Константин Анатольевич | (1.5.6) |
| 15. | Д.х.н. | Овчинникова Татьяна Владимировна | (1.4.9) |
| 16. | Д.б.н. | Сапожников Александр Михайлович | (1.5.3) |
| 17. | Д.б.н., член-корр. РАН | Тоневицкий Александр Григорьевич | (1.5.6) |
| 18. | Д.х.н. | Уткин Юрий Николаевич | (1.4.9) |
| 19. | Д.х.н., член-корр. РАН | Цетлин Виктор Ионович | (1.4.9) |
| 20. | Д.х.н. | Шахпаронов Михаил Иванович | (1.4.9) |
| 21. | Д.х.н. | Ямпольский Илья Викторович | (1.4.9) |

Мирошников А.И., председатель: Ну что, коллеги, начинаем? Значит у нас сегодня две защиты. Первая защита — Григоров Артем Сергеевич, «Роль малых регуляторных РНК микобактерий в адаптации к стрессам» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология. Научный руководитель — Татьяна Леодоровна Ажикина. Официальные оппоненты: Кубарева Елена Александровна из Института Белозерского МГУ и Мокроусов Игорь Владиславович из Санкт-Петербургского научно-исследовательского Института эпидемиологии и микробиологии, отсутствует по причине командировки. Ведущая организация — Центр физико-химической медицины имени Лопухина ФМБА. Пожалуйста.

Олейников В.А., ученый секретарь: Это у нас Григоров, да?

Мирошников А.И., председатель: да, Артем Сергеевич.

Олейников В.А., ученый секретарь: *(зачитывает информацию о соискателе и документах, содержащихся в личном деле соискателя).* Артем Сергеевич Григоров окончил в восемнадцатом году биологический факультет МГУ по специальности биоорганическая химия, далее с шестнадцатого по девятнадцатый — старший лаборант-исследователь, с девятнадцатого по настоящее время — младший научный сотрудник лаборатории регуляторной транскриптомики нашего Института. Кандидатский экзамен — отлично, молекулярная биология. Работа выполнена в лаборатории регуляторной транскриптомики ИБХ, научный руководитель — Татьяна Леодоровна Ажикина, доктор биологических наук, руководитель лаборатории. По теме диссертации опубликовано 6 статей. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно четвертого октября двадцать третьего года, и все необходимые документы в деле есть.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Пожалуйста, Артем Сергеевич, 20 минут.

Григоров А.С., соискатель: *(Излагает основные положения диссертационной работы).*

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Вопросы? Да, Роман Гербертович?

Ефремов Р.Г.: Спасибо, интересно, но уж я не являюсь специалистом в области мРНК. Вопрос такой: как вы предсказывали с помощью биоинформатики потенциальные решения действия малых РНК, и что из себя представляет, все-таки, с точки зрения структуры, молекулярный комплекс РНК-РНК. Тем более, что у них у каждой, вы показываете, есть вторичная структура, то есть они претерпевают какие-то серьезные конформационные изменения, что ли? Природа комплекса?

Григоров А.С., соискатель: Природа комплекса — просто открытые одноцепочечные последовательности, которые присутствуют во вторичных структурах, как малых РНК, так и, вот, чаще всего, 5'-нетранслируемых областях. Вот в данном случае, у F6 петля, в которой открыт участок, который взаимодействует вот с этим участком. Соответственно, вот тут происходит раскрытие двухцепочечного участка при взаимодействии. А как мы предсказывали — существуют программы-предсказатели, которые анализируют последовательность и вторичную структуру, соответственно, малых РНК и ...

Ефремов Р.Г.: То есть ищут возможные такие вот петлевые участки и комплементарность, да, оценивают?

Григоров А.С., соискатель: Да.

Ефремов Р.Г.: А вот все-таки, есть ведь, наверное, структура, установленная таких комплексов? Потому что тут небольшая, сравнительно, петля, вот эта — циклический фрагмент. Довольно жесткая структура, по-видимому. И когда происходит, должно происходить спаривание оснований комплементарных, то, наверное, большие напряжения должны возникать, чтобы и условиям комплементарности оснований удовлетворить, и как бы, сохранить свойства макроцикла этого. То есть это такая серьезная, видимо, перестройка. Извините, что задаю вопрос, просто мне это интересно, никогда не слышал вот о конкретных комплексах.

Григоров А.С., соискатель: Вот в данном случае, транс-кодируемые РНК характеризуются как раз очень небольшими областями спаривания. Это 6, максимум 10-12 нуклеотидов у бактерий. И вот что дальше происходит — это вопрос, потому что может с помощью малой РНК привлекаться какие-то дополнительные белки просто к этому комплексу, которые и будут оказывать влияние ...

Ефремов Р.Г.: А структуры, уже установленные, есть таких комплексов?

Григоров А.С., соискатель: Не думаю, что для микобактерий они установлены.

Ефремов Р.Г.: Ну не важно, не для микобактерий конкретно, а вот два таких петлевых участка РНК, которые как бы образуют межмолекулярный вот такой вот комплекс. Просто как там устроены вот эти макроциклы? То есть, расплетается ли ножка, чтобы больше свободы обеспечить для взаимодействия, что можете сказать? Что там происходит? Может быть их и нет таких структур, я не знаю.

Григоров А.С., соискатель: Я думаю, что для бактерий скорее всего нет таких структурных данных.

Ефремов Р.Г.: Ну не важно, бактерии или нет, просто есть РНК и РНК, они должны межмолекулярное взаимодействие какое-то сформировать, довольно сильное.

Григоров А.С., соискатель: Взаимодействие также проверяется на ряде *in vitro* экспериментов.

Ефремов Р.Г.: Ну структурные данные есть?

Григоров А.С., соискатель: Структурные, сомневаюсь, что есть.

Ефремов Р.Г.: Спасибо.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо, еще вопросы? у вас вопрос?

Завриев С.К.: Я хотел дополнить, есть ли доказательство вот такого взаимодействия? Именно, что это действительно доказано, что это взаимодействие, не то, что они там комплементарны...

Григоров А.С., соискатель: Да, вот в данном случае мы доказываем, что взаимодействие есть путем внесения мутаций в область комплементарности. При нарушении комплементарности данной области у нас модулируется экспрессия белка GFP.

Ефремов Р.Г.: Это опосредованное доказательство.

Григоров А.С., соискатель: Также мы проверяем взаимодействие «шифтом», *electromobility shift assay*, когда... это более *in vitro* метод, когда инкубируют малую РНК, соответственно, в буфере с мРНК и разгоняется в геле. И, соответственно, мы можем видеть полосу отставания в данном случае также.

Олейников В.А., ученый секретарь: Николай Владимирович?

Бовин Н.В.: У меня вопрос по эпидемиологии туберкулеза. Есть ли статистика, какая доля заражений происходит при непосредственном контакте между больным и здоровым, то есть, когда не происходит адаптации бактерии к стрессам, и какая доля заражений происходит от тех бактерий, которые уже изменились, то есть заражают пациента именно такие адаптированные бактерии?

Григоров А.С., соискатель: Спасибо за вопрос, такой статистики нет. Могу сказать, что просто известно, что латентная форма туберкулеза присутствует у каждого третьего-четвертого человека вообще на земле. И в десяти процентах случаев примерно эта болезнь способна переходить в активное состояние.

Бовин Н.В.: То есть, в любом случае, это от человека к человеку непосредственно, а не от микобактерии, которая находится вне организма?

Григоров А.С., соискатель: Вот на этот вопрос очень сложно ответить, потому что бактерия способна выживать вне организма крайне долго. То есть это и кипячение, опять же, низкие температуры, и ряд совершенно других стрессов. Она просто способна очень долго сохраняться в живом состоянии.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Василевский, пожалуйста.

Василевский А.А.: Артем Сергеевич, спасибо, хорошо очень рассказано. Вот у вас стресс... Ну, не у вас, а вы устраиваете, я надеюсь, стресс бактериям, они отвечают на это регуляторными РНК, которые потом регулируют экспрессию каких-то генов. А вот связующее звено между стрессом и этими РНК, что сенсор? Это, наверное, какие-то белки? Как они узнают стресс?

Григоров А.С., соискатель: Да, это могут быть двухкомпонентные сигнальные системы, у туберкулеза самые известные — это *DosR* и *PhoPR*, которые, соответственно, реагируют на различные стрессы. *DosR* — такая мультитаргетная, например, вещь, но, в основном, он привязан к гипоксии. И, соответственно, сигнальная молекула в клеточной стенке активируется, передает сигнал на транскрипционный фактор внутри клетки, который запускает уже транскрипцию малых РНК. И вот для *MTS1338* показано, что он находится под прямым регуляторным контролем как раз этого *DosR*, одного из важнейших транскрипционных факторов туберкулеза.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Еще вопросы? Пожалуйста

Рубцов Ю.П.: Спасибо за доклад. Ну, я не буду стрессировать, собственно, вопросы по этому слайду. Потому что понятно, что прямых доказательств, конечно, получено не было, того, что эти комплексы образуются непосредственно в микобактериях. У меня, на самом деле, есть другой вопрос. Вот вы показываете, что у вас одна из ваших РНК, которые якобы модулируют стресс, она, на самом деле, зависит от интерферона гамма. В то время как

другая РНК, она уровень этого интерферона гамма понижает. Вот, могли бы вы это как-то прокомментировать?

Григоров А.С., соискатель: Я говорю тут, что MTS1338, она... так она она свойственна патогенным бактериям, её имеет смысл рассматривать только в контексте инфекции, на самом деле. Её уровень в условиях заражения *ex vivo* действительно зависит от уровня интерферона гамма. Через NO как раз, который активирует транскрипционный фактор, который повышает её экспрессию. А приводит она к модуляции при гетерологичной экспрессии в бактерии, у которой нет гена этой малой РНК, других цитокинов, не интерферона гамма.

Рубцов Ю.П.: Спасибо

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Еще вопросы? Всё? Ну, отдохните пока. У вас вопрос?

Завриев С.К.: Немножко абстрактный вопрос, я тоже не большой специалист, поэтому так. Вот у вас, например, бактерия, да? Вы понижаете температуру, да? У вас это называется «стресс», да?

Григоров А.С., соискатель: Да.

Завриев С.К.: Каков механизм, так сказать? Ну, понятно, что ответ на это дело такой-то, да? Там синтезируются какие-то РНК, белки и так далее, да? А вот механизм сам вот... Каков механизм активации вот этого процесса устойчивости, реакции?

Григоров А.С., соискатель: Вот в случае холодного стресса все достаточно сложно, особенно для микобактерий, потому что мы...

Завриев С.К.: Не, я понимаю, что сложно. Есть какие-то данные, вот понимание вот этого или...

Григоров А.С., соискатель: Изменяется текучесть мембраны, и, соответственно, это тоже влияет на...

Завриев С.К.: Не, ну хорошо, изменяется текучесть мембраны, естественно, если понижается температура. А вот именно сам механизм?

Григоров А.С., соискатель: Я имею в виду, что изменение текучести мембраны приводит к активации определенных сигнальных белков.

Завриев С.К.: Каким образом? Ну механизм этой активации понятен?

Григоров А.С., соискатель: Я думаю, что нет.

Завриев С.К.: Ну понятно.

Григоров А.С., соискатель: Или, еще один из механизмов, который точно реализован, это изменение вторичной структуры РНК. Например, в случае низких температур повышается устойчивость определенных РНК, которые при более высоких температурах быстрее деградируют, и, соответственно, начинает нарабатываться белок, который будет влиять на адаптацию к этому стрессу.

Завриев С.К.: Ну так, в общих чертах, понятно, а конкретно...

Григоров А.С., соискатель: Нет, вот этот механизм, он известен для CspA, одного из холодошоковых белков *E. coli*.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Татьяна Леодоровна?

Ажикина Т.Л., научный руководитель: Глубокоуважаемые коллеги, ну, я хочу сказать, что в этом году Артем празднует десятилетие в нашей лаборатории. Он пришел на третьем курсе, соответственно, все ступени должные аспиранта в нашем Институте он успешно, удачно прошел. Два года — третий, четвертый курс — бакалаврский диплом. Два года — пятый, шестой курс — магистерский диплом. Четыре года аспирантуры и, через год после окончания аспирантуры, Артем представляет, на мой взгляд, достаточно большую, разнообразную, законченную работу... Ну, как законченную, закончить ничего нельзя. Конечно, малые РНК, которые нас интересуют — продолжается работа в лаборатории, и мы работаем с *in vivo* моделями, которые, к сожалению, трудно укладываются в сроки аспирантской деятельности. И, главное, что я хотела бы сказать, что за эти десять лет Артем... Его основная черта — это развитие и саморазвитие. И, придя на третьем курсе, он, конечно, очень много хотел, но умел гораздо меньше. А сейчас он по-прежнему очень мотивирован и много хочет, но... Все, что он представляет, он делал сам, он освоил биоинформатику и все биоинформатические модели и обсчеты — это его заслуга. Он хороший экспериментатор, он умеет ставить задачи, он очень критично относится к своим результатам и к чужим тоже, так что это тоже хорошо. То есть, по всем статьям, я считаю, что эти десять лет привели Артема к тому, что он стал научным сотрудником, способным решать многие задачи, и я прошу Диссертационный совет учесть мое мнение.

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

Олейников В.А., ученый секретарь: (*зачитывает положительное заключение*). Так, ну тут речь идет о заключении, во-первых, которое той организации, в которой выполнялась эта работа — работа выполнялась в нашем Института. Тут заключение у меня в руках, оно утверждено директором нашего Института, Габитовым Александром Габитовичем. Ну, и, конечно, первый пункт — это биографические данные, в принципе, они зачитывались в начале нашего заседания, поэтому я повторять их не буду. Я только скажу, что, значит тема утверждена на заседании ученого совета двадцать пятого мая двадцать второго года. Научный руководитель только что выступила, Татьяна Ажикина. Подготовленная диссертационная работа была обсуждена на открытом заседании отдела геномики и постгеномных технологий нашего Института. Ну и, конечно, первое — это актуальность исследования, которое базируется на том, что туберкулез — это очень нехорошее заболевание. И на том, что, несмотря на то что изучение малых регуляторных РНК у микобактерий уже более десяти лет ведется, тут есть огромные пробелы в наших знаниях. И, соответственно, это определяет во многом актуальность данной работы. Личное участие — все эксперименты в диссертационной работы при активном и непосредственном участии. Результаты проведенных исследований — ну тут я зачитывать не буду, поскольку мы это только что слышали в докладе. Степень достоверности — данные, полученные в работе, характеризуются надежностью и воспроизводимостью, экспериментальные методы самые современные. Новизна — ну здесь в этой работе я насчитал четыре слова «впервые», и, значит, проанализирован транскриптомный ответ *M. smegmatis*, охарактеризован фенотип и транскриптом штамма *M. smegmatis*, и так далее. Плотное изложение материала, опубликовано 6 работ, в хороших статьях. Ну и, соответственно, выводы данного

заклучения — эта работа, диссертация «Роль малых регуляторных РНК микобактерий в адаптации к стрессам» рекомендуется к защите. Заключение принято на открытом заседании, присутствовало 15 человек, результаты голосования — единогласные, председатель семинара — Николаев, секретарь — Плешкан. Всё подписано зам. директора Ямпольским и, как я уже сказал, утверждено директором нашего Института, Александром Габировичем Габировым.

(Далее зачитывает отзыв ведущей организации, отзыв положительный). Теперь отзыв ведущей организации. Значит, в качестве ведущей было у нас государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физ-хим медицины имени академика Лопухина ФМБА России». Опять же — отзыв полностью положительный, опять же все это в начале, так сказать, подчеркивается актуальность, что изучение регуляторных РНК свободноживущих микобактерий важно для определения их экологической роли и понимания механизмов взаимодействия с другими микроорганизмами, и так далее. Научная новизна — ну, опять же, впервые подробно проанализирован транскриптомный профиль, впервые охарактеризован фенотип и транскриптом штамма *M. smegmatis*, ну и так далее. Обоснованность и достоверность — работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, с использованием современных методов. Результаты экспериментов описаны подробно и последовательно, то есть вот это подчеркивает обоснованность и достоверность научных результатов. Значимость — теоретическая и практическая, на практике работа открывает перспективы для дальнейшего изучения некодирующих РНК *M. tuberculosis* в области диагностики и терапии туберкулеза. Структура — классическая, сто шестьдесят две страницы, включает сто восемьдесят девять наименований по ссылкам. Обзор литературы дает представление о некодирующих РНК бактерий в целом. Материалы и методы содержат подробно и достаточно для воспроизведения описания. Раздел «Результаты и обсуждение» как раз представляет те результаты, которые были уже сегодня доложены, о которых уже он говорил. А вот замечания по содержанию. Значит, принципиальные замечания к работе отсутствуют, но тем не менее, есть ряд дополнений, которые сделали бы работу более понятной для читающего.

Первое: «Обзор литературы начинается с описания подходов по поиску некодирующих РНК, однако само определение малых РНК и описание механизмов их действия дается в главах ниже. Наверно, более понятным было бы описание непосредственных объектов исследования перед методами их поиска».

Второе: «Во введении обзора литературы также недостаёт общего описания микобактерий с указанием на интересующие автора объекты: *M. tuberculosis* — как этиологического агента туберкулеза, *M. smegmatis* — как модельного микроорганизма».

Третье: «Для описываемых некодирующих РНК не хватает информации о локализации в геноме (позиции на референсных геномах)».

Четвертое: «автором приводится информация о времени адаптации *M. smegmatis* к холодовому стрессу, однако результаты не сравниваются с кривыми роста бактерии без стресса, что было бы наглядно».

И, следующее замечание, возможно, будет являться продолжением работы: «Интересно было бы увидеть наличие/отсутствие описываемых нкРНК среди всего разнообразия геномов микобактерий».

Ну, данные замечания не уменьшают значимости работы. И, в заключении: «диссертационная работа Григорова Артема Сергеевича соответствует критериям ВАК, а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности Молекулярная биология».

Отзыв обсужден, одобрен, утвержден на межлабораторном семинаре отдела биомедицины и геномики, лаборатории молекулярной генетики человека, лабораторной молекулярной генетики микроорганизмов, лаборатории прикладных биомедицинских микросистем. Ну и, соответственно, подпись кандидата биологических наук, зав. лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ ФХМ имени Лопухина ФМБА России, это Шитиков Егор Александрович. Ну и, соответственно, отзыв утвержден генеральным директором этого Института — членом-корреспондентом РАН, доктор биологических наук Лагарькова.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Артем Сергеевич, будете отвечать? Повторить? У вас есть вопросы?

Григоров А.С., соискатель: Да, я согласен с тем, что можно было бы организовать литературный обзор лучшим образом. Я скажу, что в данном случае я руководствовался тем, что в разделе про малые РНК я уже использую какие-то описания методов, поэтому я решил привести их в начале. По поводу того, что стоило бы подробнее описать местоположение в геномах малых РНК и больше текста уделить описанию *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium smegmatis* — согласен. По поводу сравнения адаптации к холодному стрессу и кривых роста — могу привести вот эту картинку. Вот эта приведена в основном разделе презентации, и вот эта — рост *Mycobacterium smegmatis* при тридцати семи градусах. Видно, что вот эта точка роста, примерно ОД 0.6 — ОД, с которой начинали действие стресса. И видно, что до ОД 1 бактерия дорастает где-то за 4-5 часов. Тогда как в условиях холодного стресса до этого ОД чтобы дорасти, ей требуется порядка 45 часов. И, по поводу наличия гомологов открытых РНК, которые могут участвовать в адаптации к холодному стрессу — мы в данный момент действительно ведем эту работу по поиску у других микобактерий.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Владимир Александрович?

Олейников В.А., ученый секретарь: Значит, в Диссертационный совет поступили два отзыва на автореферат диссертации. (*Зачитывает отзывы на автореферат. Отзывы положительные*). Оба отзыва положительные. Значит, на высоком методическом уровне работа выполнена, собран обширный разносторонний материал. И значит первый отзыв — это Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Центральный научно-исследовательский Институт туберкулеза», подписал ведущий научный сотрудник лаборатории иммуногенетики этого Института, Линге, кандидат биологических наук. Второй отзыв подписан старшим научным сотрудником группы редактирования геномов микроорганизмов Института биохимии имени Баха, Шумков Михаил Сергеевич. Ну вот тут вот, любопытно, есть замечание-вопрос «Проделанная работа расширяет представление о роли малых РНК в регуляции физиологии микобактерий, вносит существенный вклад в понимание механизмов тонкой настройки реализации, может послужить основой для разработки принципиально новых подходов к диагностике и терапии. В рамках дискуссии хотелось бы услышать мнение диссертанта именно по этому вопросу: Каким образом малые РНК могут быть использованы в качестве биомаркеров или терапевтических мишеней? Есть

ли перспективы применения таких РНК для снижения жизнеспособности или диссеминации микобактерий в организме больного?». Значит, вот такие вот предложения к дискуссии.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Артем Сергеевич, пожалуйста.

Григорев А.С., соискатель: В отношении туберкулеза сейчас постоянно, на самом деле, пытаются использовать малые РНК. И есть работы, которые находят малые некодирующие РНК в крови пациентов, например. Потому что это одно из таких, разрабатываемых направлений — это малые РНК, которые экспрессируются и транспортируются за пределы бактериальной клетки. И, да, второе направление, это антисенс-терапия, в данном случае мы сейчас тоже пытаемся найти какие-то подходы. Когда модифицированными олигонуклеотидами извне пытаются воздействовать на экспрессию определенных малых РНК, и в отношении MTS1338 мы проводим сейчас такие эксперименты.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Переходим к отзывам официальных оппонентов. По Zoom - Елена Александровна Кубарева, доктор химических наук из Института Белозерского МГУ. Пожалуйста.

Кубарева Е.А., оппонент: Добрый день глубокоуважаемые коллеги. Меня нормально слышно? Прежде всего, приношу свои извинения за то, что не смогла присутствовать на вашем замечательном ученом совете, так сказать, живую, но средства телекоммуникации позволяют общаться удаленно.

(Излагает отзыв, отзыв положительный). Все мы, конечно, знаем, и привыкли к тому, что регуляция транскрипции генов — это сложный процесс, который обслуживается большим количеством белков - факторов транскрипции. И вот удивительным событием было открытие того факта, что эту роль в бактериях также выполняют десятки малых некодирующих РНК. Длина таких РНК составляет примерно 150-300 нуклеотидных звеньев. И диссертационная работа Артема Сергеевича посвящена изучению роли как раз таких малых некодирующих РНК микобактерий. Надо сказать, что малые некодирующие РНК сейчас довольно широко изучаются во многих научных группах в мире, но в микобактериях их никто не изучает. И достоинством работы является то, что в рассмотрение было взято две микобактерии. Одна — патогенная, которая является возбудителем туберкулеза; и другая — непатогенная, в каком-то роде, аналог этой патогенной бактерии *Mycobacterium tuberculosis*. И в настоящее время уже накоплено очень много доказательств как раз для разных бактериальных систем, что малые некодирующие РНК вступают в свое действие как регуляторы транскрипции в особые периоды существования клетки. Как правило, в те моменты, когда клетка испытывает какой-либо стресс или какое-то воздействие, которое угрожает ее жизнедеятельности. Таким образом, важность и актуальность изучения малых некодирующих РНК определяется действительно их центральной ролью в реализации механизмов выживания и адаптации бактерии в разнообразных условиях окружающей среды. И, надо сказать, что если какие-то отдельные моменты ученым удастся понять, то, в целом, вот действительно, картина, механизм вот этой регуляции — он остается неясным. Конечно, работа Артема Сергеевича представляет собой интерес и для прикладных биомедицинских направлений, как только что он сказал. Действительно, данные, которые он получает, могут быть использованы в разработке новых методов диагностики туберкулеза и других инфекционных заболеваний. И, может быть, даже в терапии инфекционных заболеваний, которые вызывают микобактерии.

Рассматривая диссертационную работу, скажу, что она имеет традиционную структуру. Обзор литературы всесторонне освещает текущее положение в области изучения малых некодирующих РНК микобактерий, именно микобактерий, и также систематизирует методы, используемые при их изучении. В своей работе, как вы видели, Артем Сергеевич использует огромный арсенал самых разнообразных и самых современных молекулярно-биологических, биохимических и биоинформатических методов, и все они очень подробно описаны в главе «Материалы и методы». И, как вы уже поняли из доклада, и я думаю, я не ошибусь, я скажу, что любимым методом методом исследования Артема Сергеевича является именно транскриптомный анализ. И этот метод предусматривает не только сложную подготовку библиотек кДНК, но и обработку данных высокопроизводительного секвенирования. И вот в главе «Материалы и методы» диссертант приводит фактически пошаговую инструкцию всей последовательности проведенного им статистического анализа. Еще я хочу добавить, что я просила Артема Сергеевича проконсультировать моих студентов с факультета биоинженерии и биоинформатики по обработке данных высокопроизводительного секвенирования, и он является прекрасным педагогом — он блестяще справляется с этой задачей. Студенты второго курса после его лекций могут самостоятельно обработать данные транскриптомного анализа.

Вообще, с моей точки зрения, особенно сильной стороной работы Артема Сергеевича является ее методологическая составляющая, то есть это дизайн экспериментов, их безукоризненная статистическая достоверность и, не вызывающая никаких сомнений, формулировка выводов.

Как сказал Артем Сергеевич в своем докладе, глава «Результаты и обсуждение» содержит три тематически связанных части, с одной стороны, но каждая из частей посвящена исследованию определенной научной проблемы. И, с точки зрения новизны, на мой взгляд, особенно следует выделить первый раздел — он представляет собой детальное изучение реакций микобактерии на холодовой стресс. И это исследование выполнено на модельном организме — *Mycobacterium smegmatis* на базе транскриптомного анализа. Здесь идентифицировано 56 малых некодирующих РНК, которые могут участвовать в адаптации *Mycobacterium smegmatis* к холоду, но я подчеркну еще раз, что из них только 5 были описаны ранее. Дальше, биоинформатическими методами автор предполагает, что эти малые РНК взаимодействуют с комплементарными им участками в мРНК генов мишеней, и таким образом могут регулировать экспрессию этих генов. И вот методом биоинформатического анализа Артем Сергеевич как раз предполагает, что это могут быть за мишени. У меня всегда вот вызывают уважение такие диссертации, которые как бы дают импульс в направлении новых исследований другим, последующим поколениям студентов и аспирантов. И здесь как раз очевидна уже задача для других студентов и аспирантов группы Татьяны Леодоровны, когда надо будет найти экспериментальное подтверждение данным Артема Сергеевича, то есть другими молекулярно-биологическими методами и подходами доказать, что вот именно эти, 51 малая некодирующая РНК, что именно они участвуют в реакции бактерии на холодовой стресс.

Во второй части работы Артем Сергеевич исследует роль малой некодирующей РНК F6 *Mycobacterium smegmatis*. И вот эта часть работы, на мой взгляд, представляет полностью законченное и детально проработанное исследование. Здесь автору удалось идентифицировать прямую молекулярную мишень этой малой F6 РНК, которая располагается в 5'-нетранслируемой области мРНК гена фактора RpfE2. Мне хочется

немного пролить свет, немного рассказать по поводу первого вопроса, который возник к работе Артема Сергеевича, к этой её части. Действительно, никаких рентгеноструктурных данных не существует, и вряд ли они когда-то могут быть, потому что все мы знаем какая лабильная молекула РНК и как сложно её выделить в больших количествах. А также мы понимаем, что в кристалле вторичная структура РНК может быть совсем другой. И я думаю, что вот эти вот короткие взаимодействия, которые описывает Артем Сергеевич, они очень динамические и короткоживущие. Дело в том, что, конечно, они термодинамически невыгодны, абсолютно правильно. И поэтому наверняка существуют какие-то факторы, или какие-то условия, когда происходит коллапс вот этих двух РНК, которые должны провзаимодействовать, и такие вот коротенькие дуплексы могут образовываться. На самом деле, для других бактерий, для которых описаны такие механизмы, там тоже нет никаких доказательств в этих работах, что такие комплексы реально можно зафиксировать. Но дело все в том, что они, как правило, нужны для того, чтобы подействовали РНКазы, которые расщепляют вот такие РНК-РНК дуплексы, и таким образом препятствуют работе факторов транскрипции. Ну, заканчивая как бы обсуждение этой части работы, скажу, что вот показано напрямую участие F6 РНК в том, чтобы клетка перешла нормально в некультивируемое состояние и также показано, что F6 РНК участвует в регуляции транскрипции ряда генов, связанных с адаптацией к окислительному стрессу.

Третий раздел главы «Результаты и обсуждение», он наиболее сложный, он уже описывает некодирующую РНК MTS1338 из *Mycobacterium tuberculosis*. И здесь эксперименты проводятся на макрофагах и раскрывают некую последовательность событий, которая приводит к активации транскрипции собственно этой малой некодирующей РНК. Здесь, действительно, тоже приведен обширный пул разнообразнейших исследований, включающих эксперименты на мышах. И в целом, можно действительно сделать заключение, что вот эта вот малая некодирующая РНК MTS1338 играет значительную роль в адаптации патогенных микобактерий, ну, в частности *Mycobacterium tuberculosis*, внутри макрофага. Ну здесь, к сожалению, механизм действия этой РНК просто вообще пока непонятен.

Работа Артема Сергеевича — она действительно очень хорошая, было очень сложно найти замечания, ну кроме опечаток, которые я, конечно, перечислять не буду. У меня есть, как бы сказать, одно замечание такого, дискуссионного плана. Мне хотелось бы понять, насколько данные о роли некодирующих РНК, в частности, F6, которая есть и в *Mycobacterium smegmatis*, и в *Mycobacterium tuberculosis*, насколько данные полученные на *Mycobacterium smegmatis* могут быть экстраполированы на *Mycobacterium tuberculosis*? И, с этой точки зрения, мне кажется, было бы полезным привести данные по сравнению тех участков геномов этих бактерий, которые могут быть вовлечены во взаимодействие с малой некодирующей РНК. Тем более, что такой участок Артем Сергеевич нашел для F6 РНК в *Mycobacterium smegmatis*, и вот хотелось бы посмотреть есть он и насколько он отличается от того же участка в *Mycobacterium tuberculosis*. И применим ли механизм, что он предлагает для непатогенной бактерии, к бактерии патогенной.

Второе замечание у меня связано с тем, что в разделе 3.2.4 проводится оценка транскрипции гена F6 РНК в условиях кислого и окислительного стрессов методом нозерн-блоттинга. В тексте не поясняется, почему для оценки такой выбрана именно средняя логарифмическая роста штамма *Mycobacterium smegmatis* дикого типа, ведь возможно, что в других фазах роста отличия в эффективности транскрипции в нормальных условиях, и в условиях этих

стрессов были бы более существенными. В подписи к рисунку 33, это страница девяностая, и это слайд 14, на нем приведен рисунок зависимости оптической плотности жидких культур штаммов *Mycobacterium smegmatis* дикого типа и с делецией гена F6 РНК. Измерения проведены в условиях окислительного стресса. И ни в подписи к рисунку, ни в тексте не было указано в какой фазе роста были отобраны пробы. Кроме того, концентрация перекиси водорода в подписи к рисунку составляет 500 микромоляр, а в разделе 2.15, это «Материалы и методы» — 5 микромоляр. И, таким образом, непонятно, какое из значений концентрации перекиси водорода является верным.

В разделе 2.17 главы «Материалы и методы» автор очень подробно описывает работу с мышами. Но в личном разговоре выяснилось, что Артем Сергеевич лично с мышами эксперименты не проводил, а эти эксперименты проводились сотрудниками Центрального научно-исследовательского Института туберкулеза. И мне казалось бы правильным, чтобы это было отражено в «Материалах и методах», или в благодарностях, возможно, и были бы указаны фамилии тех сотрудников, которые эти эксперименты проводили.

Ну, в работе еще имеется ряд недочетов, есть англицизмы. Некоторые из них, например «характеризация» - все-таки по-русски это «характеристика», «секвестрация», «рестрицировали» - мы не рестрицируем, а линейаризуем, все-таки, ну и ряд других. Некорректным является термин «фосфатно-солевой буфер» - все-таки у нас Институт биоорганической химии, и следовало бы, наверное, указывать, какой именно буфер использовали — натрий- или калий-фосфатный, и pH раствора. В работе есть большое количество приложений и, вот, в частности в приложениях Л, С, У и Ф белки и их функции — они должны быть написаны по-русски, в работе они указаны по-английски.

Понятно, что указанные ниже замечания носят рекомендательный характер и не снижают высокой оценки работы. Позвольте, я зачитаю заключение: «Диссертационная работа Григорова Артема Сергеевича представляет собой законченное, масштабное и комплексное исследование роли малых некодирующих РНК в адаптации микобактерий к новым условиям существования и исследование выполнено на мировом уровне. Полученные диссертантом данные позволяют расширить наши знания о молекулярных механизмах адаптации *Mycobacterium smegmatis* и *Mycobacterium tuberculosis* к холодному и окислительному стрессам, переходу в некультивируемое состояние и жизнедеятельности внутри макрофага, что обеспечивает основу для разработки новаторских подходов в диагностике и лечении туберкулеза. Диссертационная работа Григорова Артема Сергеевича соответствует критериям установленным Положением о присуждении ученых степеней, а сам диссертант, безусловно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности Молекулярная биология». Спасибо вам большое за внимание.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо, спасибо Елена Александровна за разбор диссертации. Артем, пожалуйста.

Григоров А.С., соискатель: Я начну с вопроса про экстраполяцию данных по F6 на *Mycobacterium tuberculosis*. В данном случае я не могу привести данные о последовательностях, потому что мишень, которая обнаружена у *Mycobacterium smegmatis* — отсутствует у *Mycobacterium tuberculosis*. Несмотря на то, что F6, как я говорил, консервативна у обеих микобактерий, и вот этот самый главный взаимодействующий петлевой участок — он у них одинаков. Также нами было обнаружено... Ранее было описано, что F6 ген у *Mycobacterium tuberculosis* находится под контролем сигма-фактора

sigF у *Mycobacterium tuberculosis*, а у *Mycobacterium smegmatis* нами было показано, что он находится под контролем... мы обнаружили последовательность сигма-фактора sigD, и, наоборот, не обнаружили последовательность sigF. То есть, скорее всего, у них и регуляторная природа несколько разная, у этих микобактерий. И в данном случае функции, по всей видимости, различаются для этих малых РНК.

Теперь, по поводу того, что мы исследовали для F6. Все эксперименты делали на логарифмической стадии роста по той причине, что F6 начинает синтезироваться с раннего логарифма и в логарифме ее достаточно большое количество. Поэтому мы ожидали обнаружить все эффекты уже в этой стадии роста. Соответственно, транскриптом был сделан в этой стадии роста, и все эксперименты со стрессами были сделаны там же.

По поводу концентрации перекиси — правильная концентрация будет 500 микромоль, в «Материалах и методах» 5 микромоль — это, конечно, опечатка.

И, инфекция мышей *Mycobacterium tuberculosis* действительно проводилась в Центральном научно-исследовательском Институте туберкулеза сотрудниками лаборатории иммуногенетики под руководством Александра Соломоновича Апта, и в частности, Константином Майоровым, за что я им очень благодарен. Невключение их в «Материалы и методы» диссертации обусловлено моей невнимательностью.

Мирошников А.И., председатель: Все? Спасибо.

Кубарева Е.А., оппонент: Спасибо

Мирошников А.И., председатель: К сожалению, второй оппонент у нас отсутствует, в командировке, Мокроусов Игорь Владиславович. Пожалуйста, зачитайте отзыв.

Олейников В.А., ученый секретарь: (зачитывает положительный отзыв второго оппонента). Ну, после столь подробного разбора, который Кубарева Елена Александровна дала, я позволю себе со значительными сокращениями зачитать тот отзыв от официального оппонента, который дал Мокроусов Игорь Владиславович. Ну отзыв положительные полностью, актуальность, новизна, структура строго соответствует научным стандартам. Соответственно, дана структура. Описано, дано мнение, положительное, о вступительной части, материалы и методы, результаты и обсуждение, о которых мы слушали сегодня достаточно подробно. Теперь замечания к диссертационной работе: «Общее и частное впечатление очень хорошее, но есть несколько несущественных замечаний: в тексте появляются опечатки, иногда встречаются не совсем точные формулировки, которые, тем не менее, не снижают общего качества представленного материала». А вот вопросы для дискуссии есть:

Первое: «Как холодовой стресс влияет на общую физиологию и метаболизм бактерий, есть ли данные о долгосрочных адаптациях к низким температурам? Идентифицированы ли конкретные белки или пути сигнализации, которые активируются или подавляются при холодовом стрессе?» Это первое.

Второе: «В какой степени экспрессия малой РНК F6 может участвовать в адаптации *M. smegmatis* к антибиотикам и возможно ли аналогичное влияние в *M. tuberculosis*?».

Третье: «Имеются ли данные о том, как изменения в экспрессии идентифицированных генов, которые происходят при гиперэкспрессии MTS1338, коррелируют с изменениями в физиологии и поведении бактерий?».

Ну вот это все замечания, а далее заключение, что диссертационная работа соответствует, а сам диссертант, Григоров Артем Сергеевич, заслуживает, несомненно, присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 — молекулярная биология.

Ну еще раз повторю, Мокроусов Игорь Владиславович, зав. лаборатории молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики Федерального бюджетного учреждения науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский Институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера».

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Артем Сергеевич, ну, похоже, на половину вопросов ответы уже были, но тем не менее, не повторяйтесь, пожалуйста.

Григоров А.С., соискатель: Конечно. Про холодовой стресс скажу тут, что, так как мы описали транскриптом, мы можем сказать, что есть какое-то представление о том, что происходит с бактерией в данных условиях. И из долгосрочных адаптаций, что есть — это повышение экспрессии ряда белков, которые участвуют в синтезе осмопротектантов, это изменение липидной композиции клетки, и набора транспортеров и транскрипционных факторов. Что отличает от, например, других бактерий — это то, что мы обнаружили, что в акклимационный период снижается экспрессия генов рибосомальных белков. А также то, что вообще в течении всего холодого стресса не происходит повышения экспрессии белка холодого шока, который является центральным у *Escherichia coli*.

Антибиотики — мы проверяли мутантный штамм *Mycobacterium smegmatis* на действие различных антибиотиков, и не нашли отличий от дикого типа. В данном случае результаты не приведены, потому что результат негативный. И, соответственно, про экстраполяцию на туберкулез я уже говорил.

И, как экспрессирующиеся гены, которые экспрессируются при гиперэкспрессии MTS1338 влияют на физиологию клетки — это, в первую очередь, наши эксперименты о том, что часть этих белков повышает выживаемость клетки в условиях различных стрессов, в частности окислительного, кислотного и нитрозативного. Также есть свидетельство о том, что некоторые из этих белков участвуют также в переходе *Mycobacterium tuberculosis* в покой, в замедлении метаболизма.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Коллеги, ну, начинаем дискуссию? У меня такое впечатление, что мы уже все выговорили. Но, тем не менее. Кто хотел бы выступить? Ну я так и думал, что, наверное, все понятно. Пожалуйста, заключительное слово вам.

Григоров А.С., соискатель: Я хотел бы выразить свою признательность и благодарность своим оппонентам, также я хотел бы поблагодарить сотрудников Центрального научного Института туберкулеза, а именно лабораторию иммуногенетики Александра Соломоновича Апта и сотрудников Института биохимии имени Баха, лаборатории Салиной Елены Геннадьевны. Также я хотел выразить благодарность сотрудникам лаборатории структуры и функций генов человека, группы иммуноонкотерапии и лаборатории регуляторной транскриптомики за помощь в выполнении экспериментов, ценные советы и поддержку в течение всего времени выполнения этой работы. И, конечно, самую большую благодарность я хочу выразить моему научному руководителю — Ажикиной Татьяне Леодоровне.

Мирошников А.И., председатель: Спасибо. Коллеги, предлагается состав счетной комиссии — Алексей Анатольевич Белогуров, Виктор Ионович Цетлин и, естественно, Олейников. Есть возражения? Кто против? Нет. Решили.

Мирошников А.И., председатель: Давайте проголосуем.

(Идет тайное голосование).

Олейников В.А., ученый секретарь: Я зачитываю, значит, Григоров Артем Сергеевич. Присутствует на заседании 21 член совета, роздано бюллетеней — 21, оказалось в урне — 21, за — 21, против, недействительных — нет.

(Протокол с результатами голосования утверждается единогласно)

Олейников В.А., ученый секретарь: По заключению есть замечания?

(Бовин Н.В. и Овчинникова Т.В. сообщают о незначительных орфографических правках в тексте заключения. С учетом этого Диссертационный совет единогласно принимает заключение).

Заседание Диссертационного совета объявляется закрытым.

Председатель
диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович

