

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

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01
23 сентября 2020 года

Защита диссертации **Коротковой Дарьей Дмитриевной** на тему:
«Роль нового белка холоднокровных c-Answer в регуляции пуринэргического
и FGF сигнальных путей при регенерации и в развитии мозга»

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Специальность 03.01.03 – Молекулярная биология

Москва – 2020 г.

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета Д 002.019.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, от 23 сентября 2020 года.

Заместитель председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 4.

1.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
2.	Член-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
3.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(03.01.06)
4.	Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
5.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(03.01.06)
6.	Академик РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
7.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
8.	Член-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
9.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(03.01.03)
10.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
11.	Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
12.	Д.б.н.	Мурашев Аркадий Николаевич	(03.01.06)
13.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(02.00.10)
14.	Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
15.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(03.01.03)
16.	Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(02.00.10)
17.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
18.	Член-корр. РАН	Цетлин Виктор Ионович	(02.00.10)
19.	Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
20.	Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)
21.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(02.00.10)

Ефремов Р.Г.: Уважаемые члены диссертационного совета, уважаемые коллеги. Позвольте мне открыть очередное заседание нашего диссертационного совета. В повестке дня защита Коротковой Дарьи Дмитриевны. Кандидатской диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Название диссертации, да по специальности 03.01.03 молекулярная биология. Название диссертационной работы «Роль нового белка холоднокровных c-Answer в регуляции пуринаргического и FGF сигнальных путей при регенерации и в развитии мозга». Научный руководитель – д.б.н. Андрей Георгиевич Зарайский. В качестве официальных оппонентов выступают – Пантелеев Андрей Александрович, к.б.н., руководитель лаборатории тканевой инженерии и регенеративной биомедицины НИЦ «Курчатовский институт» и центра НБИКС технологий, Григорян Элеонора Норайровна, д.б.н. руководитель лаборатории «Проблемы регенерации» Федерального государственного бюджетного учреждения науки институт биологии развития им. Кольцова РАН. Ведущая организация .Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Московский государственный университет им. Ломоносова». Владимир Александрович, ознакомьте, пожалуйста, членов диссертационного совета кратко с содержанием личного дела соискателя.

Олейников В.А.: Так, значит, Короткова Дарья Дмитриевна, гражданка РФ, окончила в 2019 году каф. биоорганической химии биофака МГУ по специальности биоорганическая химия. С 2017 по 2020 год она младший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза нашего института. Работа выполнена в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза нашего института, в Институте биоорганической химии, научный руководитель, уже было сказано, д.б.н. Андрей Георгиевич Зарайский. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, в т.ч 6 статей в рецензируемых журналах. Объявление о защите, автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно 21 мая 2020 года и все необходимые документы в деле имеются.

Ефремов Р.Г.: Спасибо, у присутствующих есть вопросы по повестке дня и по личному делу соискателя? Нет вопросов, тогда, Дарья Дмитриевна, пожалуйста, вам слово для изложения основных положений диссертационной работы

Короткова Д.Д.: *(Излагает основные положения диссертации)*

Ефремов Р.Г.: Спасибо. Вопросы, пожалуйста. Ну, тогда позвольте мне начать дискуссию. Вот вопрос по первой части. То есть единственный гомолог, который вам удалось найти, по аминокислотной последовательности – это FGFR4 рецептор, но степень гомологии там порядка 25-27 процентов. Да. Вы утверждаете, что рецептор имеет, ваш белок имеет трансмембранный домен, но при этом как бы основываетесь на данных флуоресцентной микроскопии, утверждая, что он лишь локализован на поверхности мембраны, но это, есть ли у вас доказательства, что действительно есть цитоплазматический домен, это может быть периферический мембранный белок, какие аргументы в пользу того, что это трансмембранный домен?

Короткова Д.Д.: Аргументы, что это трансмембранный домен. Во-первых, компьютерные программы, которые позволяют предположить наличие трансмембранного домена. Этот домен был именно идентифицирован как трансмембранный домен. Затем, когда мы исследовали локализацию EGFP-c-Answer гибрида на клеточной мембране, мы видели его не только на клеточной мембране, но и в эндоплазматическом ретикулуме, а также в везикулах и, я думаю, что, ну это как жизненный цикл трансмембранного белка, он подходит к мембране в везикулах.

Ефремов Р.Г.: Ну, понятно, то есть это не прямые доказательства, скажем так.

Короткова Д.Д.: Да, хорошо, но вот нам показалось, что конфокальная микроскопия позволяет, ее разрешение, может быть, сказать о том, что это трансмембранный, и вид

этого, структура, белка, которую мы анализировали в компьютерной программе, позволяет судить, о том, что это трансмембранный.

Ефремов Р.Г.: Ну, это предположение, это гипотеза, которая, на мой взгляд, правдоподобная, поскольку есть высокая степень гомологии с рецептором FGFR4, что очень интересно, на мой взгляд. Вот, следующий вопрос, вы предлагаете гипотетическую модель димера, гомодимера, также основываясь на свойствах FGFR4, по-видимому, потому что у вас структурных данных никаких нет.

Короткова Д.Д.: На свойствах FGFR4 и на основании того, что у с-Answer есть нечетное количество цистеинов и, возможно, то есть возможно, цистеин свободный будет связываться с другим.

Ефремов Р.Г.: Ну, возможно, а возможно и нет.

Короткова Д.Д.: Ну если бы он не связывался, то мы бы так и сказали. Но мы предположили, проверили предположение и оно оказалось верным, поэтому мы занесли его в результаты.

Ефремов Р.Г.: Нет, ну у вас есть прямые экспериментальные доказательства существования гомодимера?

Короткова Д.Д.: Да, это ко-иммунопреципитация с последующим Вестерн-блоттингом. Мы инъецировали эмбрионов. Например, у меня были разные делеционные мутанты. Инъецировала один эмбрион, обязательно был инъецирован полноразмерным с-Answer, одна часть эмбрионов, другая была инъецирована каким-либо из мутантов с разным набором доменов. Дальше мы эмбрионы инкубировали, в них синтезировался белок, мы затем их лизировали, проводили ко-иммунопреципитацию. Все вот эти конструкции, они меченные, либо MYC, либо FLAG. Одна была, полноразмерная, мечена MYC, а все другие были мечены FLAG. Но они раздельно все закалывались, соответственно. Дальше мы проводили ко-иммунопреципитацию. На смоле, например, с MYC. Если проходило взаимодействие, то дальше можно было провести Вестерн-блот в антителами к FLAG. И если, например, оно село на смолу за MYC, если есть взаимодействие с FLAG, то мы антителами FLAG увидим. Если нет взаимодействия, то антитела ничего не дадут.

Ефремов Р.Г.: Ну понятно, стандартный подход такой.

Короткова Д.Д.: Да, да. То есть, если, как это, считать это за прямое доказательство или нет, инъецированы они были в разные эмбрионы, то есть они там не могли взаимодействовать при инъекции, разные группы эмбрионов. Они были лизированы отдельно, только затем они были, лизаты были смешаны и инкубированы. То есть взаимодействие, если оно могло происходить, то оно происходило вот в этом, в процессе этого взаимодействия, в процессе инкубации совместной.

Ефремов Р.Г.: Понятно.

Короткова Д.Д.: То есть такие биохимические доказательства.

Ефремов Р.Г.: У с-Answer нет киназного домена.

Короткова Д.Д.: Нет.

Ефремов Р.Г.: Да, то есть, а, вы считаете, что, просто это очень интересный объект, поскольку мы рецепторными тирозинкиназами довольно много занимаемся, вы считаете, что лигандом является FGF8, да? Одним из лигандов.

Короткова Д.Д.: Мы проверяли, проверяли. Но, как мы выяснили, FGF8 напрямую с с-Answer взаимодействовать не может. Он является лигандом FGFR4. То есть к с-Answer мы тоже его проверяли, как и рецепторы, но там взаимодействия не было. Мы не выявили это

ко-иммунопреципитацией и Вестерн-блоттингом. Не нашли прямое. Нет. Нет. Мы только вот рецепторы смогли установить.

Ефремов Р.Г.: Спасибо, а еще вопрос, вот по инъекции, то есть как вы вводили белок и как вы контролировали, что он достиг вот места на мембране. Ну понятно, по флуоресценции можно.

Короткова Д.Д.: Вводили мы не белок, мы инъецировали мРНК данного гена и мы закалывали вместе вот с мРНК также трейсер, то есть такую флуоресцентную смесь, которая позволяла нам потом на флуоресцентном микроскопе видеть инъецированный материал, его распределение. То есть вот эта флуоресцентная смесь смешивалась с мРНК и по ней мы следили. Попало в зародыша, не попало, как распределилось. На некоторых фотографиях вы видели такую зеленую флуоресценцию, это как раз по ней можно проследить инъецированный материал. Он у меня часто как раз был в мозге или там в глазах. Вот, то есть следили распределение флуоресцентного материала по флуоресцентному сигналу. А флуоресцентный этот вот препарат мы закалывали вместе с мРНК. И белок синтезировался в процессе роста зародыша с мРНК.

Ефремов Р.Г.: Спасибо, так, еще вопросы, пожалуйста. Александр Габибович. Татьяна Владимировна, да.

Овчинникова Т.В.: Очень короткий вопрос, значит, белок экспрессируется после ампутации, а в интактных покровных тканях на уровне транскриптома, вообще он присутствует?

Короткова Д.Д.: На уровне транскриптома мы не смотрели по тканям, потому что таких данных мы не получали. Но мы смотрели методом гибридизации *in situ* его экспрессию. Здесь видна поверхностная экспрессия, он экспрессируется в покровных тканях. Вот здесь, например, есть нервная пластинка, но мы не видим например четкого окрашивания нервной пластинки, мы также видим, что и по краям, в эктодерме, в покровных тканях тоже есть небольшая экспрессия. Она более выражена в нервной пластинке, но и в покровных тканях она тоже присутствует. Мы также видим, что здесь не очень четкая тоже экспрессия в конкретно бластеме, также она есть в раневом эпителии. В контрольном случае мы видим, что экспрессии нету без ампутации. Это уже взрослые зародыши, это взрослые ткани. Но если говорить о ранних стадиях, то экспрессия в покровных тканях есть.

Ефремов Р.Г.: Александр Габибович.

Габибов А.Г.: У меня технический вопрос. Вы, конечно, молодец, поскольку, как говорится, кто смел, вам удалось, поэтому, но все-таки вот, когда делаете выключение, значит, антисенсы, то все-таки знайте, что оно далеко не то что стопроцентно, а часто даже меньше 50-ти. Вот у вас столбик, может я что пропустил, то есть вы все-таки считаете, что убедительно у вас получилось, вот эта остаточная активность она не могла обеспечить какого-то такого подтекания, да?

Короткова Д.Д.: У меня даже так получилось, что нокдаун с помощью антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов дал больший эффект, чем нокаут. И вот это...

Габибов А.Г.: Вот это меня тоже немножко удивило.

Короткова Д.Д.: Это даже было описано в каких-то статьях вот недавно, что когда мы делаем нокаут, то, возможно, активируются какие-то компенсаторные механизмы. Поскольку это происходит на очень ранних этапах и на уровне гена, может быть, что какие-то компенсаторные пути активируются и эффект немножко нивелируется, тогда как вот морфолиновые олигонуклеотиды, они антисмысловые к мРНК и просто не может идти уже синтез белка, поэтому может поэтому у меня вот в результате нокдауна эффект сильнее, чем в результате нокаута.

Габибов А.Г.: Может быть я не читал последние публикации, но у вас правда, вы компенсировали сомнения генотипированием. И в общем сами себя убили. И нас.

Ефремов Р.Г.: И рецензентов, я думаю, тоже в статьях, если это опубликовано.

Короткова Д.Д.: Да, опубликовано. Да, я тоже сомневалась сначала, но потом Андрей Георгиевич предложил сделать генотипирование и вот в результате генотипирования результаты были очень интересные, я совершенно не ожидала увидеть таких больших инсерций и делеций. Действительно рамка совершенно сбивается и нарушается полностью ген. Поэтому на результаты можно на эти полгаться, которые были получены при нокауте и нокдауне.

Ефремов Р.Г.: Так, коллеги, еще вопросы есть? Вопросов больше нет, тогда, пожалуйста, вы пока отдохните. Спасибо за доклад, слово предоставляется научному руководителю, Андрею Георгиевичу. Пожалуйста, о соискателе.

Зарайский А.Г.: Значит, я сразу скажу, чтобы не терять времени, что я могу только соискателя характеризовать в превосходных выражениях, вот а конкретно более, могу сказать, что Даша пришла к нам очень рано, где-то на 2м курсе еще до распределения по кафедрам МГУ и все это время вот пока она училась, она собственно мало училась, а занималась вот этой работой. Поэтому ей удалось все это так сделать, хотя на учебу это никак, на учебе это никак не сказалось. Потому что она с красным дипломом защитилась, то есть это тоже характеризует ее очень так положительно. Она очень такой собранный человек и может в короткое время себя взять в руки и сделать конкретную очень работу, в том числе вот по учебе. Ну и конечно вот эта работа вся, когда мы, значит, с биоинформатиками нашли эти гены, которые исчезли у теплокровных, у высших позвоночных, то не знали, что с ними делать, там было порядка 10 генов, ну и вот в это время как раз появилась Даша и мы ей дали на попробовать один ген и дальше это все пошло развиваться, но вот именно благодаря Даше, потому что работа буквально на 80% сделана ее руками. Она тут проводила все время, вот, и показала себя с самой лучшей стороны, она умеет работать, умеет работать с литературой, соответственно, руками, добиваться результата, ставить задачи, такие небольшие, их решать, то есть это вполне сложившийся исследователь и, конечно, я считаю, что ее работа она полностью заслуживает присуждения ей искомой степени. Мне было очень приятно с ней работать.

Ефремов Р.Г.: Почему было?

Зарайский А.Г.: Ну да, мы надеемся продолжить, потому что вот то, что она тут рассказывала, оно имеет продолжение сейчас и оно очень интересное продолжение, в связи с гормонами. Оказалось, что этот c-Answer регулирует гормоны, и за счет вот этого может быть такое эволюционное преимущество получили те древние, значит, кто они были, амфибии, у которых этот c-Answer исчез и у них ускорилось развитие в результате. И это сейчас нужно исследовать все. Потому что когда Даша делала CRISPR мутантов, то оказалось, что головастики, они гораздо потом, эти мелкие головастики, начинают вдруг бешено расти и очень быстро вырастают. Вот это очень интересно и надеюсь, что мы да, продолжим это все дальше.

Ефремов Р.Г.: Здорово, спасибо, Андрей Георгиевич. Так, мы переходим к заслушиванию отзывов. Сначала заключение организации – это наш институт, где выполнялась работа, Владимир Александрович.

Олейников В.А.: Да, ну, во-первых, заключение организации. Действительно, наш институт, ну, биографические данные, я хочу подчеркнуть, что она окончила биофак в 2019 году, но с 2017 уже младший научный сотрудник здесь, каким-то образом, да, замечательным. Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета в 2019 году и принято заключение, что диссертационная работа Коротковой посвящена изучению роли

специфичного для холонокровных белка *c-Answer* в регенерации крупных придатков тела и в развитии мозга, а также механизмов и роли взаимодействия неизвестного ранее белка *c-Answer* с рецепторами, ну, соответственно, о которых мы слышали. Личный вклад. Да, основные экспериментальные данные получены лично автором. Актуальность определяется необходимостью изучения функций *c-Answer* в процессе эмбрионального развития и в ходе регенерации. Научная новизна заключается в том, что впервые был описан совместно с лабораторией математических методов и моделей в биоинформатике ИППИ институт, отсутствующий у теплокровных животных модулятор пуриnergического и FGF сигнальных путей. Ключевой результат работы подчеркивается. Кроме теоретической ценности для молекулярной биологии и эмбриологии, изучение функционирования впервые описанного гена *c-answer*, утраченного в ходе эволюции теплокровных позвоночных, полезно для установления причин потери способности к регенерации конечностей у теплокровных позвоночных, в том числе человека, что может иметь практическую значимость для регенеративной медицины. Ну, и в заключение здесь отмечается, что данная работа соответствует и заключение принято на открытом заседании отдела геномики и постгеномных технологий нашего института, присутствовало 19 человек, все «за» и подписано Мартынова Наталья Юрьевна, зам.зав.лабораторией молекулярных основ эмбриогенеза и доктор химических наук Ямпольский, утверждено директором нашего института Александром Габировичем Габировым. Это что касается заключения. Далее официальный отзыв ведущей организации, в качестве которых это - Университет имени Ломоносова. Ну опять же традиционно начинается с актуальности темы исследования, здесь пишется «следует отметить, что исследование причин утраты способности к регенерации крупных придатков тела теплокровными животными и прогрессивного развития у них переднего мозга – эти задачи представляют огромный интерес для фундаментальной науки». Научная новизна отмечается и здесь вот подчеркивается, что в настоящей работе в ходе изучения физиологических и молекулярных функций одного из обнаруженных данным методом генов *c-answer* впервые было показано, что *c-answer* экспрессируется в ходе регенерации хвоста и почки задней конечности головастика, а также в период раннего развития мозга. Далее, впервые показана уникальность молекулярной роли *c-Answer*, являющегося трансмембранным модулятором активности рецепторов различных типов. Таким образом, в работе впервые был описан открытый отсутствующий у теплокровных животных модулятор пуриnergического и FGF сигнальных путей *c-Answer* и сформулирована гипотеза о его роли в эволюции позвоночных, ну далее описано, что это параметры, характеристики диссертации формальные, она изложена на 108 страницах, список литературы 117 источников, обзор литературы, результаты. Результаты свидетельствуют об успешном решении поставленных задач, достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Обсуждение результатов обосновывает полученные в работе выводы, рекомендации по использованию результатов диссертации. Результаты имеют большую научную ценность для продвижения понимания механизмов раннего развития мозга и регенерационных морфогенезов у позвоночных и могут быть рекомендованы к использованию в профильных биологических и медико-биологических исследованиях. Принципиальных замечаний по диссертации Коротковой Дарьи Дмитриевны нет, но возникли некоторые пожелания по дальнейшему продолжению исследования. Было бы очень интересно для полноты картины проследить активность исследуемого белка при частичной утрате регенерационной способности в процессе регенерации конечности в пострефрактерный период онтогенеза у шпорцевой лягушки непосредственно перед метаморфозом и далее, когда возможно только образование покрытой кожей хрящевой спиккулы. Что касается некоторых оформительских недочетов, то можно отметить некоторые из них. Хотелось бы видеть список сокращений в начале работы. В главе Материалы и методы лучше было бы соединить характеристику объекта и манипуляции с ним, не разбивая изложение описанием других методов. Ряд иллюстраций был бы более информативен при более рациональной компоновке и большей четкости в

подписи. Встречаются погрешности в списке литературы. И не следует употреблять выражение «экспрессия белков» - экспрессируется ген. Однако все эти отмеченные недочеты не снижают общего хорошего впечатления о работе также как и отдельные стилистические погрешности не влияют на положительную оценку диссертационной работы. И на основании изложенного можно сделать вывод, что диссертационная работа является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится, ну и так далее. Содержание диссертации полно отражено в автореферате. Данная работа полностью соответствует требованиям Положения о присуждении ученых степеней. Отзыв составлен профессором кафедры эмбриологии, доктором биологических наук профессором Голиченковым и ведущим научным сотрудником этой же лаборатории Бурлаковой. На заседании присутствовало 21 человек, «за» - 21, «против», воздержавшихся не было. И подписано: заведующий кафедрой эмбриологии биологического факультета МГУ им. Ломоносова, д.б.н., член-корр. РАН А.В.Васильев и утверждено проректором Федяниным.

Ефремов Р.Г.: Дарья Дмитриевна, в отзыве ведущей организации прозвучали замечания и пожелания, ответьте, пожалуйста. Замечания касаются оформления в основном.

Короткова Д.Д.: Я согласна с отзывами, с пожеланиями и замечаниями ведущей организации. Прозвучало в замечаниях предложение провести исследование по экспрессии данного гена в период пострефрактерный у шпорцевой лягушки. Это может быть сделано в качестве продолжения данной работы. Что касается опечаток в списке литературы и ясности в подписи к картинкам, это может быть доделано и я полностью согласна со всеми пожеланиями и замечаниями.

Ефремов Р.Г.: Спасибо, так, насколько я понимаю, письменных отзывов на автореферат в диссертационный совет не поступило.

Олейников В.А.: Да, не поступило.

Ефремов Р.Г.: Поэтому мы приступаем к заслушиванию отзывов официальных оппонентов. Так, тогда первый официальный оппонент у нас – Пантелеев Андрей Александрович НИЦ Курчатовский институт, пожалуйста.

Пантелеев А.А.: Уважаемые коллеги, добрый день. Я вообще по регламенту должен как-то представиться, так сказать, или я не знаю, какой формат?

Олейников В.А.: Жесткого регламента нету, вас уже представили.

Пантелеев А.А.: *(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается).* Все, я думаю, этого достаточно, да. Хорошо. Сегодня я должен вам представить работу Дарьи Коротковой. И сразу мне хотелось бы сказать, что и чтение работы, и Дарьин доклад и так сказать моя возможность поделиться с вами своим мнением они мне доставляют большое удовольствие, потому что работа очень достойная. Теперь по существу, я бы начал с общих вещей. С тех моментов, которые, на мой взгляд, выделяют эту работу из общего фона кандидатских диссертаций на сходные тематики по сходным вопросам и здесь я бы хотел сказать следующее. Работа Дарьи посвящена выявлению молекулярного механизма, участвующего в контроле двух фундаментальных морфогенетических процессов – это формирование головного мозга и регенерации. Тут необходимо отметить, что оба этих биологических феномена, они вызывают огромный интерес вообще. Они находятся на пике современной биомедицины и особенно регенеративной биомедицины. То есть первое, что выделяет эту работу, это действительно большая ее актуальность и очень большой интерес к тем проблемам, которые в работе затронуты. И здесь я могу добавить только одно, что множество компаний, и фармакологических в том числе, занимаются, так сказать, изучением этих процессов и это все имеет не только фундаментальное значение, но и прикладное, потому что понимание развития того или иного органа дает возможность выявить механизмы, контролирующие его функции и соответственно найти возможность

как-то модулировать этот процесс. А то что касается регенерации, то выявление новых механизмов в любом случае чрезвычайно интересно с клинической точки зрения, потому что сейчас ну это одна из наиболее актуальных тем биомедицины. То есть первое, что отличает эту работу, это ее действительно высокая актуальность. Второе, хотя по объему представленного материала и по, так сказать, уровню анализа этого материала работа Дарьи не выходит за рамки требований, предъявляемых к кандидатским диссертациям, по уровню постановки задачи и, учитывая, что в основе этой работы лежит очень на мой взгляд элегантная фундаментальная гипотеза, это все роднит эту работу уже с докторской диссертацией. Я не призываю, так сказать, рассматривать эту работу как аналог докторской, естественно нет, но вот по постановке задачи, эта работа, на мой взгляд, выходит, так сказать, за рамки среднего уровня подобных исследований. И третье, что мне хотелось бы отметить – это сочетание традиционных подходов, используемых в биологии развития с методами эволюционной генетики, это, конечно, очень интересно и я считаю, что вот такое сочетание, оно дает возможность понять очень серьезные и важные процессы, которые, так сказать, контролируют те или иные функции организма. Вот это вот три основные вещи, которые, мне кажется, стоит отметить в самом начале. То что касается содержания самой работы, то, и организации этой работы, так сказать, вот собственно как сам манускрипт оформлен, все это, так сказать, выдержано в классическом стиле, здесь нет никаких, так сказать, девиаций, все нормально, хорошо, четко. Работа включает обзор, в котором очень правильно и очень понятно очерчена, так сказать, область исследований, понятно, что в этой области происходит, какие существуют проблемы, какие есть, так сказать, открытые вопросы, и предложены методики для решения этих вопросов, то есть обзор написан очень достойно. То что касается экспериментальной части работы, то Дарья очень подробно все осветила в своем докладе, здесь мне добавить в общем особенно нечего. Я остановлюсь только на двух аспектах. Во-первых, работа очень четко организована. То есть вот у нас есть новый ген с неясной функцией, есть гипотеза и необходимо, так сказать, посмотреть каким образом функции этого гена подтверждают или опровергают эту гипотезу и вот так сказать на пути достижения этой поставленной задачи у Дарьи все очень четко организовано, то есть начало с выявления доменной структуры, через экспрессию, через поиск мишеней, через поиск, так сказать, партнеров к функции, то есть, если говорить о методологической части, то здесь добавить вообще абсолютно нечего. Работа очень комплексная и, как я уже сказал, очень хорошо организована. Единственное, что я бы добавил, это, может быть, глобальное геномное профилирование при использовании активации и подавлении гена в разных физиологических контекстах, методом или *microarray*, может быть, или глобального РНК-секвенирования, но это уже, так сказать, может быть, выходит за рамки кандидатской диссертации. Может быть, это стоит, так сказать, в будущем продолжить и, если уже о будущем говорить, конечно, было бы очень интересно перейти ну, так скажем, к млекопитающим, посмотреть, а что же там и какие из возможных мишеней этого гена, этого, так сказать, каскада можно активировать или как-то, так сказать, модулировать у высших позвоночных и можно ли добиться каких-то интересных эффектов. Это вот первое. То что касается собственно фактологической части. И второе: Дарья использовала в своей работе очень много самых разных методов и хотя они в общем все хорошо известны и, так сказать, не новые и активно используются сотнями самых разных лабораторий, они все очень трудоемкие и требуют чрезвычайной концентрации и мотивированности исследователя. И использование делеционных мутантов, и *whole mount in situ* гибридизация, и ко-иммунопреципитация, и использование CRISPR/Cas9 методологии. Все это методы известные, но требующие хороших рук и очень хорошей головы. И то что у Дарьи все это хорошо получилось, то что она получала стабильные и совершенно без всякого сомнения хорошие результаты говорит о том что она сложившийся экспериментатор, который может ставить задачу и который может решать проблемы, которые, технические проблемы, которые неизбежно при использовании этих методов возникают. Это сложная, кропотливая работа вот эти вот два момента я бы хотел отметить.

Организацию работы и то что Дарья, так сказать, подтвердила, что она сложившийся ученый-экспериментатор, ну в этом собственно функция кандидатской диссертации и состоит. И хотел бы я закончить ну уже такими формальными словами, что работа соответствует всем требованиям, все поставленные задачи они, так скажем, достигнуты, выводы соответствуют этим задачами безусловно совершенно Дарья заслуживает, так сказать, искомой степени. Но я, честно говоря, забыл сказать о тех вопросах и недочетах и, позвольте мне, ну буквально две минуты, хотя я уже так сказать свое мнение высказал, но тем не менее я к этому вернусь. Вот что же собственно в работе вызвало у меня вопросы. Ни методология, ни постановка задачи, ни достоверность результатов никаких сомнений не вызывают, но вот логика выбора того или иного подхода иногда бывает не ясна при чтении этой работы. Ну исследовательская работа она сродни, может быть, криминальному расследованию, понимаете. Если у вас есть какой-то подозреваемый, для этого должны быть какие-то основания, на основании чего вы подозреваете там, например, тот или иной ген или тот или иной каскад в выполнении тех или иных функций и в криминалистке это все нужно обосновывать, почему. Вот, читая Дарьину работу, у меня не всегда были ответы вот на этот вопрос, почему выбран тот или иной каскад или та или иная группа генов. И собственно вот мои вопросы по этому поводу, в связи с этим. При оценке влияния уровня *c-answer* на процесс регенерации использовались 6 генов – это, соответственно, *fgf8,20*, это *agr1*, *wnt5a*, *gas-dva1* и *msx1b*. Все эти гены они, без всякого сомнения, имеют отношение к регенерации, есть соответствующие публикации, но при таком подходе я бы все-таки использовал какие-то классические маркеры. Вот из этого перечня, из этих 6 генов только, может быть, *wnt5a* является таким классическим маркером процесса восстановления тканей, но я бы выбрал гены, может быть, из сигнальных каскадов *notch*, *BMP*, *sonic hedgehog*, *TGF-beta*, вот что-то, так сказать, классическое. Это, собственно, мой первый вопрос, почему были выбраны вот те вот гены. Я понимаю, что, так сказать, лаборатория с ними работает уже много лет и это было проще, но тем не менее я бы выбрал что-нибудь такое более классическое. Второе: в тексте диссертации указано, что молекулярный каскад, запускаемый *Fgf* рецепторами, активирует, по-крайней мере, три внутриклеточных сигнальных пути: это фосфорилирование митоген-активируемой киназы *Erk*, это активация фосфолипазы-С гамма и активацию фосфатидилинозитол-3 киназы (PI3K). И выбрано почему-то было только влияние *c-Answer* на *Erk* киназу, но, если мы говорим о регенерации, PI3K, на мой взгляд, было бы более интересным, так сказать, более интересной мишенью, поскольку гигантское количество работ существует по этому белку и очень много известно о влиянии соответствующего каскада на процессы регенерации. Это вот мой второй вопрос. И третий, мне все-таки не совсем остается ясным выбор пуринэргического пути сигнального как возможной мишени, собственно, активности гена. Этот выбор был совершенно правильный, то есть в конечном итоге, так сказать, все получилось очень хорошо, и сомнений никаких в том, что это было выбрано правильно, нет, но почему был выбран именно вот этот вот путь, именно этот каскад, ну мне не совсем понятно. По поводу *FGFR4* у меня нет вопросов, здесь все понятно, потому что там *fgf8* активируется, *fgf20*, и сходство, так сказать, по доменной структуре, но вот то что касается пуринэргического пути мне не совсем понятно. Я понимаю, что когда человек работает многие годы над какой-то темой, тем более в лаборатории, которая, так сказать, этой темой занимается очень долго, многие годы, многие вещи кажутся так сказать самоочевидными для человека, но для постороннего, так сказать, взгляда, для человека, который работает с какими-то другими каскадами или другими механизмами, ну нужно какое-то подтверждение логическое для вот такого выбора. Вот на этом позвольте закончить и в целом моя оценка работы очень позитивная. Работа очень достойная, которая, на мой взгляд, ну, так скажем, предстает нашу науку с хорошей стороны очень, поэтому я надеюсь, что Дарья будет и дальше этим заниматься с тем же успехом. Спасибо.

Ефремов Р.Г.: Да, Андрей Александрович, ну там в конце отзыва оппонента обычно приводится некая сакраментальная фраза, которая должна прозвучать, что диссертация соответствует положению.

Пантелеев А.А.: Я об этом сказал перед моими замечаниями, я просто забыл о моих вопросах, так сказать.

Ефремов Р.Г.: В любом случае в письменном отзыве это есть.

Пантелеев А.А.: Это есть.

Ефремов Р.Г.: Просто это может быть важно, на это обращают внимание в инстанциях.

Пантелеев А.А.: Естественно, я готов это еще раз повторить, работа очень достойная, соответствует всем требованиям и собственно диссертант заслуживает без всякого сомнения присуждения искомой степени.

Ефремов Р.Г.: Спасибо, так, Дарья Дмитриевна, ответьте, пожалуйста, на замечания прозвучавшие.

Короткова Д.Д.: Спасибо за отзыв, отвечаю на замечание по поводу выбора экспрессии, по поводу выбора маркеров регенерации. Мы выбирали маркеры регенерации, которые были описаны в литературе для объекта модельного, которого мы, на котором мы работаем. Для мыши, может быть, маркеры регенерации немножко другие, но для *Xenopus*, для лягушки, для шпорцевой лягушки это основные маркеры регенерации. Потом в нашей лаборатории мы работаем с этими генами очень много и они, часть из них, были открыты в нашей лаборатории они уже описаны в литературе, опубликованы в виде статей, поэтому мы используем это как надежные маркеры, потому что мы можем положиться на эти гены, мы сами с ними работаем и знаем их поведение и поэтому мы используем их как маркеры регенерации. Следующий, следующее замечание, почему мы исследовали влияние на ERK путь, сигнальный путь, хотя FGFR рецептор запускает еще два других сигнальных пути. Мы использовали именно этот сигнальный путь, потому что мы просто хотели выяснить, влияет ли c-Answег на активность FGFR. В дальнейшем могут быть исследованы и другие сигнальные пути, измерено, может быть выявлено, как c-Answег влияет на активность других двух сигнальных путей, которые активируются при активации FGFR, но мы проводили предварительные пока что исследования, мы показали, что c-Answег действительно активирует данный сигнальный путь, дальше могут быть проведены дополнительные исследования, но вот одного этого сигнального пути уже достаточно для того чтобы показать что c-Answег активирует, модулирует активность FGFR4. И следующий вопрос, это почему был выбран рецептор P2ry1 для проверки на взаимодействие с c-Answег. Мы выбрали этот рецептор, потому что была опубликована некоторое время назад статья про этот рецептор на шпорцевой лягушке и эта статья, она как раз в ней изображения головастиков, в которых был оверэкспрессирован рецептор P2ry1, то есть эффекты физиологические, они полностью совпадали с теми, которые мы получили, то есть они были абсолютно идентичны и по фенотипу не было сомнений что данные рецепторы, рецептор P2ry1 и c-Answег могут как-то находиться в одном сигнальном каскаде, если не взаимодействовать. Поэтому мы проверили и вот действительно это предположение оказалось верным.

Ефремов Р.Г.: Андрей Александрович, вы удовлетворены ответом соискателя?

Пантелеев А.А.: Вполне, да.

Ефремов Р.Г.: Спасибо. Так, следующий оппонент, к сожалению, не присутствует по болезни, по уважительной причине, Григорян Элеонора Норайровна. Владимир Александрович, пожалуйста.

Олейников В.А.: (Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается). Да, у меня в руках отзыв, подписанный оппонентом Григорян. Отзыв полностью положительный. Ну здесь уже много говорилось о новизне, актуальности, здесь в отзыве все это очень четко отражено. По поводу структуры диссертации здесь есть слова четкие совершенно, излагаются дальше основные положения фактически диссертации, о которых мы сегодня, достоинства диссертации, о которых мы слышали, ну я просто хочу отметить, некоторые сейчас зачитать, так сказать, фрагменты, в которых какие-то вопросы, сомнения, пожелания. Значит, вот, Глава 2 раздела «Результаты» посвящена изучению экспрессии *c-Answer* в эмбриогенезе и в процессе регенерации конечностей и хвоста головастиков шпорцевой лягушки. В подробном изложении этой интересной части работы есть небольшие недочеты. Возникает вопрос, не мешало ли распознаванию специфического сигнала при гибридизации *in situ* наличие пигментированных клеток – меланофоров, присутствующих в регенерирующей ткани? В этой же главе раздела «Результаты» дана информация работы (Briggs и др., 2018) по секвенированию на уровне одной клетки. Приведенная в тексте диссертации заимствованная картинка, к сожалению, тяжело «читается», а обсуждение этой работы наряду с собственными данными уместнее было бы разместить в разделе «Обсуждение». Далее глава 3.3. раздела «Результаты» приводится исследование физиологической и молекулярной функций *c-Answer* в развитии переднего мозга с помощью методов активации и ингибирования функции гена *c-answer*. Но здесь пишется в частности что фенотипические изменения часто носили количественный характер, а именно изменение размеров тех или иных отделов мозга и глаз. Здесь уместен вопрос – были ли сделаны попытки измерения с помощью компьютера при исследовании полученных изображений развивающихся эмбрионов лягушки, выборка для подобного рода вычислений представляется вполне достаточной. Далее блокирование трансляции мРНК *c-answer* проводили методом инъекций в эмбрионы антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов к *c-answer* мРНК. Значит, мутации приводили к аномалиям развития эмбрионов. Параллельно была проведена необходимая большая работа по оценке частоты мутаций в последовательности *c-answer* для 2-го и 6-го экзонов в результате нокаута *c-answer* с помощью системы CRISPR/Cas9. Несмотря на то, что число видимых эффектов при ингибировании функции гена обоими способами было невелико, делается вывод об уменьшении переднеголовных структур (конечного мозга и глаз) у головастиков. Здесь сомнения также могли бы быть сняты количественными данными, полученными с помощью обмеров изображений, и подтверждающими это наблюдение. Ну далее опять так сказать все без замечаний и наконец здесь вот в конце выделены просто еще конкретные, да. Вот пишется: список использованных в работе Коротковой Д.Д. методов внушительен. Все методы адекватны для решения поставленных в работе задач. Замечание относится к отсутствию (в большинстве случаев) описания контролей и числа повторов экспериментов. Другая претензия – неудачное размещение раздела материалы и методы в конце манускрипта. Оказалось, что обращаться к деталям выполнения экспериментов каждый раз в конец диссертации - довольно сложно. Но а в целом, да вот подчеркивается, что список литературы представлен 117 ссылками и в заключение пишется что работа, название работы полностью соответствует всем требованиям, в том числе п.9, предъявляемым к кандидатским диссертациям положения о присуждении ученых степеней, а ее автор, Короткова Дарья Дмитриевна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология. Подписано официальный оппонент - главный научный сотрудник лаборатории «Проблемы регенерации» Института биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН Доктор биологических наук Григорян Элеонора Норайровна. Все.

Ефремов Р.Г.: Дарья Дмитриевна, пожалуйста, вам слово для ответа на замечания.

Короткова Д.Д.: Спасибо за отзыв. Первое замечание относилось к тому, не мешало ли наличие меланофоров – пигментных клеток, нам распознаванию сигнала гибридизации *in*

situ и я могу сказать, что нет. У шпорцевой лягушки достаточно мало меланофоров, особенно в ходе регенерации хвоста они не мешают распознаванию сигнала гибридизации in situ. В крайних случаях нами были применены ингибиторы меланофоров и мы могли их применять для того чтобы, если мы видели, что они мешают, меланофоры мешают нам распознавать сигнал in situ, при исследовании развития мозга мы могли добавлять ингибитор меланофоров и наблюдать результат, то есть с этим проблем у нас никаких не было. Следующее замечание касается расположения картинки, заимствованной картинки, которую лучше было поместить в обсуждение из результатов, но мне кажется, что она больше подходит и более логична там, где она находится, в разделе результаты. Что касается математических обчетов изображений, их анализа, они были проведены. И статистика, полученная в ходе моей работы, основывается как раз на обчете компьютерных, на компьютерном обчете изображений, которые были у меня получены. Что касается замечаний по поводу методов, я думаю, что это, они могут быть и до результатов, и после, каждому удобнее по-разному их читать. Поэтому все, наверное.

Ефремов Р.Г.: Так, спасибо, спасибо. Так, тогда мы заслушали все обязательные отзывы и заключения и теперь можем переходить к свободной дискуссии. Коллеги, кто хотел бы высказаться о представленных. Так, а вы, пожалуйста, присаживайтесь.

Короткова Д.Д.: Ага.

Ефремов Р.Г.: О представленных результатах работы, о сделанных выводах и вообще выразить свое отношение к тому, как нам голосовать. Пожалуйста. По-видимому, все уже кто хотел, все уже высказались. Татьяна Владимировна, да, пожалуйста.

Овчинникова Т.В.: Очень коротко просто, все естественно устали. Но я хочу сказать, что это абсолютно выдающаяся работа, как и все работы, которые последнее время защищаются из лаборатории Андрея Георгиевича. В общем мы должны поздравить вас с этой работой, восхищаемся уровнем работ, которые проводятся в этой лаборатории, и я буду голосовать бесспорно «за» и всех призываю тоже голосовать «за».

Ефремов Р.Г.: Спасибо большое, ну и я не удержусь, еще от себя хотел тоже добавить, что мне представляется чрезвычайно интересным сам факт обнаружения такого белка, который очень похож на RTK – рецепторные тирозинкиназы, но без киназного домена с высоким уровнем гомологии трансмембранного сегмента с известными рецепторами. Просто дело в том, что некоторое время назад, ну вот лет 10 назад, когда мы начинали эту методику с Арсеньевым Александром Сергеевичем мы искали все возможные RTK, но оказалось можно было искать и не обязательно RTK, то есть можно было искать и вот такие белки, похожие на c-Answeг, и я просто не спросил, потом спрошу, есть ли похожие еще белки, то есть тоже без киназного домена битопные трансмембранные с одним трансмембранным сегментом, что они из себя представляют, ну, короче, мы обратим внимание на этот класс белков, очень может быть любопытно. Я призываю тоже, я считаю, что работа очень достойная, выполнена на высоком уровне и техническом, и идеологическом, буду голосовать за. Так, коллеги, есть ли еще какие-то мнения. Ну, я не вижу, тогда, пожалуйста, Дарья Дмитриевна, вам слово для того чтобы сказать, о том, что диссертационному совету можете сообщить.

Короткова Д.Д.: Я хотела бы выразить свою благодарность всем, кто мне помогал в этой работе. Во-первых, моему научному руководителю, который провел очень много времени для того, чтобы помочь мне с этой работой, обучить меня методам и обсуждать данную работу. Также сотрудникам лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза, которые тоже приняли большое участие в обучении меня всем методам, которые могли помогать мне в выполнении экспериментов, также я хотела бы поблагодарить сотрудников лаборатории математических методов и моделей в биоинформатике, которые приняли участие в разработке биоинформатического подхода, в результате которого и был обнаружен данный

ген. И я бы хотела также поблагодарить Александра Габибовича и Татьяну Владимировну за то, что они очень поспособствовали тому, чтобы моя защита и подготовка к ней прошла успешно, и всех, кто помогал мне в оформлении документов и сдаче экзаменов. Спасибо большое.

Ефремов Р.Г.: Спасибо. Так, уважаемые члены диссертационного совета, тогда мы приступаем к процедуре голосования.

Олейников В.А.: Может, заключение сразу мы сначала.

Ефремов Р.Г.: Ну давайте, Владимир Александрович, давайте, конечно.

Олейников В.А.: По поводу заключения есть какие-то предложения?

Ефремов Р.Г.: Николай Владимирович, не может быть. Настолько хорошая работа, что даже и нет предложений. Дарья Дмитриевна, пожалуйста, занимайте свое место. Да, ну состав счетной комиссии уже был озвучен, так что предлагаю всем начать процедуру голосования, пожалуйста.

(Идет тайное голосование)

Ефремов Р.Г.: Самый важный момент, Владимир Александрович, пожалуйста.

Олейников В.А.: По диссертации Коротковой Дарьи Дмитриевны: присутствовало - 21, роздано - 21, в урне - 21, «за» - 21, «против» и недействительных нет.

Ефремов Р.Г.: Спасибо. Так, предлагаю утвердить результаты голосования. Кто «за»? «Против»? «Воздержался»? Единогласно. Так, ну и нам осталось утвердить сейчас. Утвердим сначала проект заключения совета. Уважаемые члены диссертационного совета, кто за то чтобы утвердить по обеим диссертациям наше заключение совета, кто «за»? «Против»? «Воздержался»? Нет. Ну, таким образом, мы завершили сегодняшнюю работу по защите двух диссертаций и, разрешите мне как председателю второго заседания поздравить обоих соискателей. Очень приятно было слушать и вы показали, на мой взгляд, очень высокий научный уровень и от души мы вас всех поздравляем. Спасибо.

Зам. председателя совета

д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремов

Ученый секретарь

д.ф.-м.н. В.А. Олейников

