

СТЕНОГРАММА

Заседания Диссертационного совета 24.1.037.01 созданного на базе
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.
Овчинникова Российской академии наук

29 июня 2022 года

Защита диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Паршиной Еленой Анатольевной

**«Роль зиксина, белка фокальной адгезии, в регуляции уровня
транскриптов генов-маркеров стволовых клеток»**

по специальности 1.5.3 - молекулярная биология

Москва 2022 г.

СТЕНОГРАММА

заседания Диссертационного совета 24.1.037.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 29 июня 2022 года.

Заместитель председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович

Ученый секретарь
диссертационного совета

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

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 8.

1. Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
2. Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
3. Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
4. Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.5.6)
5. Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
6. Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(1.5.6)
7. Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(1.5.6)
8. Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(1.4.9)
9. Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
10. Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(1.5.3)
11. Член-корр. РАН, д.б.н.	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. Академик РАН, д.б.н.	Лукьянов Сергей Анатольевич	(1.5.3)
15. Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
16. Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
17. Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
18. Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
19. Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
20. Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Ефремов Роман Гербертович: Уважаемые коллеги! Если нет возражений, то предлагаю продолжить работу нашего совета, наше заседание. И сейчас мы переходим к рассмотрению диссертационной работы Паршиной Елены Анатольевны «Роль зиксина, белка фокальной адгезии, в регуляции уровня транскрипции генов-маркеров стволовых клеток». Работа представлена на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. - Молекулярная биология. Научный руководитель кандидат биологических наук Мартынова Наталья Юрьевна, старший научный сотрудник лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза нашего института. Официальные оппоненты: Шидловский Юлий Валерьевич, доктор биологических наук, профессор РАН, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов в развитии Института биологии гена Российской академии наук. Юлий Валерьевич в командировке, но отзыв его в деле имеется. И Лябин Дмитрий Николаевич, кандидат биологических наук, руководитель группы регуляции биосинтеза белка Института белка Российской академии наук. Ведущая организация - МГУ имени Ломоносова. Так, Владимир Александрович, ознакомьте нас, пожалуйста, с материалами личного дела.

Олейников Владимир Александрович:

(Зачитывает документы, содержащиеся в личном деле соискателя)

Да, материалы личного дела. Паршина Елена Анатольевна. Гражданка Российской Федерации. Окончила биофак МГУ по специальности эмбриология - 2018 год. С 2019 по 2020 – инженер, с 2020 по настоящее время м.н.с., лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза нашего института. Аспирантка ИБХ РАН с 2018 по 2022 гг. Канадский экзамен по специальности молекулярная биология сдан с оценкой «отлично». Работа выполнена в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза нашего института. Научный руководитель диссертационной работы кандидат биологических наук Мартынова Наталья Юрьевна, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной основ эмбриогенеза. По теме диссертации опубликовано 8 статей в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте на сайте ВАК вовремя - 7 апреля 2022 года, и все необходимые документы в деле имеются.

Ефремов Роман Гербертович: Спасибо. К Владимиру Александровичу есть вопросы по поводу личного дела соискателя? Не вижу. Тогда, Елена Анатольевна, Вам слово. Познакомьте нас, пожалуйста, с основными положениями вашей работы.

Паршина Елена Анатольевна:

(Излагает основные положения диссертационной работы)

Ефремов Роман Гербертович: Спасибо. Так вопросы, пожалуйста, коллеги. Есть у кого-то вопросы по диссертационной работе? Так, чтобы начать дискуссию. А вот что за белок, вы о нём не сказали. Ну возможно, это не входило в ваши задачи. Вот структурно, хотя бы.

Паршина Елена Анатольевна: Зиксин?

Ефремов Роман Гербертович: Да.

Паршина Елена Анатольевна: Зиксин – это такой белок, у него есть несколько функциональных частей. У него N-часть, она пролин-богатая, она связывается с белками, которые связываются с актином, например, белки Epa/VASP. Также у него есть C-конец, который содержит LIM-домены. LIM-домены, вообще они могут связывать ДНК, но конкретно для зиксина показано только в одной работе, что может связывать ДНК. А, в основном, во всех остальных работах и в нашей лаборатории показано, что он

взаимодействует этим LIM-доменами с другими белками. И было показано, что он взаимодействует с рядом транскрипционных факторов. И это имеет функциональную значимость для экспрессии ряда генов. И у него также есть сигнал экспорта из ядра, который позволяет ему перемещаться из ядра в цитоплазму. И поскольку у него нет NLS, то, соответственно, сам он в ядро ходить не может, и опять же ходит с какими-то другими белками, которые ходят в ядро.

Ефремов Роман Гербертович: Это водорастворимый белок, да?

Паршина Елена Анатольевна: Да.

Ефремов Роман Гербертович: Глобулярный? Или что о нём известно?

Олейников Владимир Александрович: Размер его?

Ефремов Роман Гербертович: Размер тут показан.

Паршина Елена Анатольевна: 664...

Ефремов Роман Гербертович: Остатка, да. То есть достаточно большой. Какие-то данные по структуре есть? То есть ему надо проникнуть через мембрану.

Паршина Елена Анатольевна: Да нет, он же внутри, он цитоплазматический белок. То есть, он экспрессируется, у него нет сигнального пептида, чтобы выйти из клетки. Это белок, который участвует в сборке контактов, и он вот так там сидит в клетке и никуда не ходит вне.

Ефремов Роман Гербертович: Ну Вы говорите, у него нет NLS...

Паршина Елена Анатольевна: Ну то есть у него нет NLS. NLS - это сигнал экспорта в ядро. Соответственно...

Ефремов Роман Гербертович: Да-да-да, и кто-то должен его туда транспортировать.

Паршина Елена Анатольевна: Ну да, он вместе...

Ефремов Роман Гербертович: Он должен через мембрану ядра как-то проникнуть, наверное. Да? Все-таки.

Паршина Елена Анатольевна: А у него есть экспортин CRM1. А это, наоборот, экспорт. Так, ну да, то есть он должен с кем-то связаться, чтобы проникнуть.

Ефремов Роман Гербертович: Ладно. Основные результаты у вас немножко другой области лежат. Это просто было любопытно, раз Вы говорите о белке, и он у Вас основной объект работы. То просто как человеку, работающему с белками хочется понять, что же это за белок такой. Спасибо. Так ещё вопросы?

Олейников Владимир Александрович: А он для онкологии как-то интересен, да?

Паршина Елена Анатольевна: Да, он является таким маркером клеточных перерождений. Причём в разных раках он по-разному. То есть для каких-то раков строках он, наоборот, когда он падает, то он является маркером перерождений, а для некоторых раков он, наоборот, когда повышается, то, наоборот, значит, что-то не так. И как раз, когда он падает, получается клетки теряют сродство друг с другом. Получается они могут мигрировать. И в частности, когда вот метастазирование происходит зиксина становится меньше в клетках.

Ефремов Роман Гербертович: Так, больше вопросов не вижу. Хорошо, Елена Анатольевна, тогда Вы, пожалуйста, присаживайтесь. И слово сейчас предоставляется Наталье Юрьевне, научному руководителю.

Мартынова Наталья Юрьевна: Елена Анатольевна у нас со студенчества. Она пришла в магистратуру к нам. Потом она окончила аспирантуру. То есть, ну где-то больше, наверно,

5 лет. Можно сказать, основной наш, за это время она стала основным сотрудником, в общем, для нашей лаборатории, который вот очень поддерживал лабораторию практически в очень многих работах. То есть это работа - это, наверное, верхушка айсберга. Все методы, которые она освоила, она делала это с такой тщательностью, что потом очень многим она помогала. И в *in situ* гибридизации и в создании люциферазных репортерных систем. То, что Вот её навык использовался очень работах. Поэтому, в общем, могу охарактеризовать её только как очень ответственного, очень талантливого человека, вообще-то редкое сочетание. Который умеет сделать эксперимент с очень большой вдумчивостью. То есть практически все эксперименты мы с ней всегда обсуждали это было на равных. И я очень рада, что она вот с нами в нашем институте. Я, конечно, призываю вас голосовать «за», потому что это очень-очень хороший сотрудник для института.

Ефремов Роман Гербертович: Спасибо большое. Мы поняли сигнал. Так, Владимир Александрович, заключение организации и отзыв ведущей организации огласите, пожалуйста.

Олейников Владимир Александрович:

(Зачитывает заключение организации)

Так, работа выполнялась в нашем институте. И вот заключение, которое даёт организация. Соответственно, диссертация «Роль зиксина, белка фокальной адгезии, в регуляции уровня транскрипция генов-маркеров стволовых клеток» представлена. Далее идут биографические некие данные, о которых мы уже сегодня слышали. Тема диссертации утверждена еще на заседании ученого совета 19 декабря 2018 года, научный руководитель, соответственно, Мартынова Наталья Юрьевна. Работа обсуждена была на открытом семинаре, отдела геномики и постгеномных технологий нашего института. Актуальность, соответственно, показывается, что эмбриональное развитие - важнейшими процессами являются дифференцировка клеток и морфогенез. Одной из актуальных проблем молекулярной биологии развития является выяснение механизмов, отвечающих за согласование процессов эмбрионального развития. Решению данной задачи может помочь поиск белков способных координировать морфогенетические движения клеток и регулировать экспрессию фактора плюрипотентности и дифференцировки. Далее говорится о том, что зиксин цитоскелетный белок. Соответственно, основная молекулярная функция зиксина контроль сборки актиновых филаментов посредством взаимодействия с несколькими белками. Далее говорится, что работа посвящена определению роли этого белка зиксина, и поскольку это важно, то это определяет актуальность данной работы. Личное участие соискателя в получении результатов: все эксперименты по получению эмбрионов, гибридизации, получению антител, созданию генетических конструкций и другое проведены лично Паршиной Е.А. Обработка и интерпретация полученных данных, а также подготовка материалов научных публикаций - с активным участием Паршиной. Результаты проведённых исследований - далее перечисляются по пунктам то, что мы сегодня слышали в прекрасном докладе. Степень достоверности - работа выполнена на высоком научном уровне. Соответственно, новизна - в работе была впервые показано, что белок зиксин регулирует уровни мРНК генов плюрипотентности у эмбрионов этой лягушки, а также в человеческих клетках и эмбрионах *Danio rerio*. Полнота изложения: опубликовано 8 статей далее приводятся здесь, как раз перечисляются эти статьи в приличных, хороших журналах. Ну, и далее подчеркивается заключение этого семинара, что работа рекомендована к защите. Соответствует заявленной специальности. И это принято на открытом семинаре отдела геномики и постгеномных технологий нашего института. Единогласное голосование. Ну и, соответственно, заключение организации утверждено директором нашего института - Александром Габировичем Габировым, академиком РАН.

(Зачитывает отзыв ведущей организации. Отзыв положительный)

Далее официальный отзыв организации ведущей, в качестве которой выступало Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Московский университет имени Ломоносова. Соответственно, этот отзыв полностью положительный. Опять же говорится об актуальности. Особенно интересно изучить возможные функции зиксина в регуляции экспрессии генов во время эмбриогенеза, когда связь морфогенетические движений с экспрессией генов чрезвычайно важна. Научная новизна, опять же, - впервые продемонстрирована способность цитоскелетного белка зиксина регулировать уровни мРНК генов плюрипотентности в различных объектах. Далее значимость: подчеркивается значимость результатов. Достоверность полученных результатов тоже, так сказать, отмечается. Оформление содержания работы: 122 страницы, соответственно, список литературы - 144 источника. Обзор литературы - хорошим понятным языком, разделён на несколько частей органично. В экспериментальной части, материалы и методы, приводятся подробная характеристика используемых методов, реактивов, реагентов, лабораторных животных. Результаты - тоже всё подробно. Выводы, сделанные автором, убедительны, не вызывают сомнения. Ну и, опять же, рекомендация: здесь вот очень интересно, что здесь не перечисляются просто организации, как обычно, так сказать, а пишется, что результаты, полученные в работе являются базой для дальнейших исследований молекулярных механизмов взаимной регуляции процессов морфогенеза, а также канцерогенеза, в которых зиксин принимает участие, как белок межклеточных контактов и дифференцировкой тканей, которая напрямую регулируется генами плюрипотентности семейства вот этих белков. Полученные автором данные имеют большую научную ценность и могут быть включены в учебно-методические пособия для школьников и студентов. Замечания: принципиальных замечаний по диссертации Паршиной нет. Приведён список сокращений с расшифровкой всех, использованных в тексте в тексте, аббревиатур, что облегчает восприятие материалов. Вместе с тем могут быть высказаны некоторые замечания по рецензируемой работе, касающиеся немногочисленных опечаток, стиля изложения. В частности, использование англицизмов, что тем не менее не снижает общего значения, общего положительного впечатления о работе. Ну и, в целом, на основании всего сказанного диссертационная работа Паршиной Елены Анатольевны соответствует положениям ВАКа о кандидатских работах, сам автор достоин, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Соответственно, подписана, заведующим кафедрой эмбриологии, доктором биологических наук, членом-корреспондентом РАН Васильевым А.В., и утверждено проректором начальником управления научной политики МГУ Федяниным Андреем Анатольевичем.

Ну без замечаний, фактически.

Ефремов Роман Гербертович: Ну да, там в явном виде, по-моему, вопросов не было. Так спасибо, Владимир Александрович. Отзывы на автореферат поступали? Нет, отзывов на автореферат нет. Хорошо, тогда мы переходим к заслушиванию официальных оппонентов. И сначала слово предоставляется Дмитрию Николаевичу Лябину. Второй оппонент в командировке. Мы потом за слушаем его отзыв письменный.

Лябин Дмитрий Николаевич:

(Излагает отзыв. Отзыв положительный)

Здравствуйтесь, глубокоуважаемые коллеги! Ну обычно, первое, что говорит рецензент/оппонент в отзыве на хорошую диссертацию это то, что работа понравилась, но я так поступить не могу. Пойду немножко дальше буду более эмоциональным, скажу, что диссертация Елена Анатольевна мне очень понравилась и произвела неизгладимое впечатление. Ну почему? Во-первых, тема исследования. Она касается одного из самых красивых разделов биологии - биологии эмбрионального развития и этот раздел не только

кладезь самых разнообразных механизмов регуляции экспрессии и Елена Анатольевна один из этих механизмов новый механизм нам показала, этот раздел также источник ответов на те вопросы, которые многих мучают с детства, в частности, откуда и как я появился в связи, с чем актуальность работы не вызывает у меня никаких сомнений. Во-вторых, не меньшую актуальность лично для меня придает диссертации один из объектов исследования - белок Yb1, Y-box связывающий белок 1, поскольку это ещё объект изысканий нашей лаборатории и особенно приятно, что результаты полученные Еленой Анатольевной соотносятся с нашими представлениями о функционировании этого белка полностью. И, наконец, в-третьих, за что стоит похвалить диссертацию, так это за, так скажем, ее логичность и ход мыслей. Что вот во время чтения работы я предполагал на основании уже сделанных экспериментов, что будет делаться дальше и к своей радости обнаруживать эксперименты дали. Ну Елена Анатольевна даже пошла дальше и провела эксперименты на человеческих клетках и на клетках *Danio rerio*, и показала, что открытый механизм такой универсальный и консервативный эволюционно.

Конечно, можно пройти по собственно рукописи. Здесь диссертация, конечно, не сможет удивить нестандартным построением. Всё построено по классическим требованиям, и в манускрипте имеются все необходимые разделы. Введение довольно лаконично, но на мой взгляд туда добавить больше нечего. Всё записано чётко, есть предпосылки и корректно сформулированы задачи исследования. Обзор литературы, по сути посвящён трем белкам – это Zyxin, Yb1 и Pou5f3, ну и некоторым другим белкам плюрипотентности. После первого прочтения мне показалось, что чего-то не хватает, поэтому я прочитал второй раз и понял, в чём дело. Просто написано всё так лаконично, кратенько, что нужно следить за каждым словом. Вот это несколько, может быть, затрудняет, но зато можно прочитать рукопись два раза и получить удовольствие дважды.

Если опустить некоторое количество опечаток, жаргонизмов и таких не особо принципиальных неточностей, то к этому разделу у меня есть три вопроса или замечания. Первое, на рисунке 6 видно, что со стадии 35-36 уровень экспрессии pou5f3.3 возрастает после того, как он упал на стадии в начале гастрюляции, но в тексте не объясняется, этот факт и человеку мало знакомому с эмбриональным развитие *Xenopus laevis* не вполне понятно, что же такого особенного происходит на 35-36 стадиях, что увеличивается количество этого гена. Наверное, было бы неплохо, вообще включить в работу, небольшой раздел, посвящённый эмбриональному развитию *Xenopus laevis*, как бы кратенько. Это бы помогло пониманию того, почему выбирались те или иные стадии для экспериментов, которые представлены в результатах. Это первый вопрос. Второй, в отношении описания Yb1, как мажорного белка мРНК. У меня следующее замечание: у *Xenopus laevis* более известен, как мажорный белок мРНК вот именно в ооцитах – белок FRGY2, гомолог Yb2 у человека. Понятно, что дальше речь будет в работе идти про Yb1 и поэтому больше внимания уделяется этому белку, но как-то отсутствие упоминания FRGY2 довольно странно выглядит. Наконец, третье, в обзоре литературы отсутствует описание одного очень важного факта участия Yb1 в эмбриональном развитии. Была одна, ну, две статьи китайских товарищей о роли Yb1 в стабилизации мРНК в эмбриональном развитии рыбки *Danio rerio* и вообще-то говоря, это вот имеет непосредственное отношение к теме диссертации и к полученным результатам, и, возможно, данную публикацию если не в обзоре литературы можно было обсудить, но в главе Обсуждение.

Следующий раздел Методы поразил меня, конечно, своими таблицами, скрупулезным описанием состава всех растворов. Всё очень подробно написано. Тем удивительнее, что один из методов, глава Манипуляции с эмбрионами *Xenopus laevis* и *Danio rerio* описана очень скупо, буквально в отношении к *Xenopus laevis* просто ссылка на одну статью. А можно сказать, я читал этот раздел исключительно из-за этой главы, но ничего не нашёл.

Глава Результаты и Методы, как я упоминал достойна всяческих похвал здесь и отличные результаты - новый механизм, показано мастерство диссертанта. Но поскольку я всё-таки

серьёзный оппонент, я задам несколько вопросов и сделаю несколько замечаний. В отношении использования морфолиновых олигонуклеотидов практически никогда не приводится доказательств, что малиновый олигонуклеотид подействовал, что, например, не приведены вестерн-блоты, показывают что, например, нокдауне *zuxin* с помощью этих морфолиновых олигонуклеотидов, действительно белок, количество белка уменьшилось. Второе, не вполне удачные рисунки 18 и 28, когда на фоне высокой экспрессии репортёрного гена в ооцитах его экспрессия после начала развития эмбриона практически незаметна. О разнице в экспрессии при нокдауне *zuxin* судить, вообще-то говоря, трудно. Третье, данные, приведённые на рисунке 19, на мой взгляд не исключают вклада транскрипции в увеличение количества мРНК *pou5f3.3* при нокдауне *zuxin*. Так как если сравнить столбцы на рисунке будет видно 2 и 4 для вот этой РНК без добавления и с добавлением актиномина можно видеть всё-таки падение относительно уровня экспрессии мРНК *pou5f3.3*, что может говорить о том, что всё-таки транскрипция здесь причём. То есть не только регуляция стабильности имеет место быть. То же касается экспериментов с оверэкспрессией Yb1, когда повышается уровень мРНК *pou5f3.3*, там, конечно, есть эксперимент по изучению активности промотора, но экспериментов с актиномицином D не было проведено. А между тем было довольно логично, что Yb1 может влиять на транскрипцию *pou5f3.3*, поскольку в присутствии Zuxin Yb1 локализуется в цитоплазме и, соответственно, не может активировать транскрипцию этого гена в ядре, а при нокдауне *zuxin* Yb1 локализуется в ядре и способен активировать транскрипцию. Четвертое, в опытах с лептомицином В, вероятно, нужен контроль на локализацию белков Yb1 и Zuxin, поскольку приходится просто верить, что действительно под действием лептомицина В произошли какие-то перестройки, перераспределение этих белков между ядром и цитоплазмой. И пятое, судя по рисунку 30 уровень мРНК *zuxin* падает при оверэкспрессии *pou5f3.3*, что предполагает регуляторные механизмы с обратной связью. То есть, чем больше получается *pou5f3.3*, тем меньше уровень *zuxin* и тем больше опять уровень *pou5f3.3*. Но это в обсуждении никак не комментируется. Собственно к следующим разделам Обсуждению и Выводам серьёзных замечаний нет. Ну, разве что в Обсуждениях закралась досадная опечатка, которая все ставит вверх ногами. Но это очевидно, что это просто опечатка. Ну пусть вас не смущает такое количество вопросов. Наверное, это не самое большое количество вопросов, которое я задавал как оппонент. Вот. Ну и скорее, они носят такой технический характер, и скорее символизируют мой искренний интерес к этой работе.

Поэтому я с чистой совестью могу прочитать заключение: по теоретической и практической значимости результатов проведённого исследования, актуальности выбранной темы, научной новизне, достоверности и обоснованности научных результатов диссертационная работа Паршиной Елены Анатольевны полностью соответствует критериям, установленным Положением о присуждении учёных степеней. А сам диссертант, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности молекулярная биология. Спасибо.

Ефремов Роман Гербертович: Спасибо, Дмитрий Николаевич. Елена Анатольевна, пожалуйста ответьте на замечания оппонента.

Паршина Елена Анатольевна: Спасибо Дмитрий Николаевич за Ваш такой отзыв. Вы очень внимательно посмотрели работу и это видно, и я сейчас постараюсь ответить на все вопросы.

Все, что касается Обзора литературы. Там обсуждалось, что на стадии 35-36 уровень экспрессии *pou5f3.3* возрастает и поскольку это происходит, поскольку в это время начинают формироваться органы и формируется кровеносная система. И вот начинается экспрессия по *pou5f3.3* в прогениторных гематопоэтических клетках. Поскольку в нашей работе мы работали на более ранних стадиях, и поэтому я в литобзоре не обратила на это внимание. Возможно стоило. Дальше про FRGY2. Да, действительно, у лягушки есть

FRGY2, и даже Yb3 есть. И стоило, конечно, о них написать в литобзоре, но поскольку в нашей работе мы рассматривали Ybx1, и именно он был найден в гибридной дрожжевой системе, и дальше вся работа была с Ybx1, поэтому я не уделила внимание другим белкам этого семейства. И также про то, что FRGY2 в ооцитах очень много, но вот по данным литературы, например, на стадиях, на которых мы работаем, на стадии гастрюлы-нейрулы, больше всего в зародышах всё-таки Yb1. Потом, так, а дальше про статьи, о том, что Yb1 участвует в сохранении мРНК у *Danio rerio* в эмбрионах. К сожалению, до того, как Вы мне показали, я не видела этих статей, но спасибо большое, что Вы мне их показали. Действительно, это интересные статьи в них написано про модификации мРНК, которые влияют на стабильность мРНК рынка, я благодарна.

И дальше про Материалы и методы. Почему про *Xenopus laevis* мало написано, там ещё в Обзоре литературы было замечание про то, что про развитие *Xenopus laevis* я не написала, поскольку это такой модельный объект исследования, уже много написано, про него есть целые книги про то, как он развивается, как с ним работать. Соответственно, просто, чтобы не увеличивать объём работы, я не описала его развитие подробно. Про материалы и методы также там дана ссылка на статью, это статья нашей лаборатории, в которой я являюсь соавтором, и там, в этой статье, не только подробно описано, как мы работаем с ксенопрусами, но там также приведены фото и видеоматериалы как мы получаем эмбрионов и так далее. И поскольку, лучше, чем в этой статье, в диссертации я не могла бы отразить, то, как там показано, то, соответственно, я посчитала возможным просто дать ссылку на эту статью.

Замечания к разделу Результаты: про вестерн-блоты на эффективность морфолино. Действительно, это моя ошибка то, что я не привела их в этой работе. Но мы всегда в статьях приводим эффективность морфолино. И вот здесь на слайде вы можете видеть, что действительно, когда морфолино инъецированы, экспрессия Zuxin уменьшается и у ксенопруса, и у *Danio rerio*. И вот они довольно-таки эффективны. Про репортерные конструкции и отражение результатов. Наверное, здесь я приводила ещё столбец с ооцитами, чтобы показать, то насколько сильно, насколько большая разница между активностью репортеров в ооцитах и в развивающихся зародышах. Возможно, это было действительно неудачно, такое отображение результатов. Дальше про лептомицин В и контроль на локализацию белков. Опыты с лептомицином В и зиксином, это очень распространенная методика исследования, и они проводятся, в основном на клетках. И на клетках очень легко смотреть по флюоресценции, например, как Zuxin локализуется. Но на ксенопусах это сложно сделать. И поскольку это отработанная методика, мы не привели данных локализации зиксина. А про Yb1 у нас, к сожалению, не было антител к Yb1 эндогенному. Поскольку мы пытались получить поликлональные антитела, но они получились неудачными, а антитела к мыши мышинные и человеческие на разные участки Yb1 они не различают лягушачий, к сожалению. Поэтому мы не могли ничего сделать здесь, и не привели этих данных. Так, дальше. А, про петлю обратной связи. Да, возможно, действительно здесь есть какая-то обратная связь между возрастом *pou5f3.3* и падением, уменьшением экспрессии гена *zuxin*. Но эти значения они не очень...разница, она не очень сильная. И, возможно, что здесь происходит какое-то не прямое ... этот эффект не прямой, а какой-то опосредованный. И, возможно, это стоит изучить в дальнейшем. Но в этой работе мы это не изучали. Всё.

Ефремов Роман Гербертович: Спасибо. Дмитрий Николаевич, Вы удовлетворены тем, как защищалась Елена Анатольевна? Вот один вопрос еще остался.

Паршина Елена Анатольевна: А да, про то, что нельзя однозначно утверждать, что в Yb1 не вносит вклад транскрипцию. Да, действительно мы не проводили эксперименты с актиномицином D. Их стоило бы провести, чтобы точно сказать, что он не участвует. Но поскольку здесь подавляется общая транскрипция в этом, поэтому возможно, что, например, как бы транскрипция *yb1* тоже падает и поэтому, возможно, разница вот между

опытом без актиномицина D и с актиномицином D может быть явлением того, что в принципе, и Yb1 тоже меньше. Но мы подробнее не изучали этот вопрос. Всё.

Ефремов Роман Гербертович: Теперь всё встало на свои места. Да? Спасибо. Так ну, как уже было сказано, Юлий Валерьевич Шидловский, второй оппонент, отсутствует, он находится в командировке. Владимир Александрович, зачитайте, пожалуйста.

Олейников Владимир Александрович:

(Зачитывает отзыв оппонента Шидловского Ю.В.. Отзыв положительный)

Вот здесь у меня в руках отзыв. Отзыв полностью положительный. Я думаю, что уже нет смысла сейчас повторять: актуальность, новизну, традиционность схемы написания, обзор литературы. Значит, по Обзору литературы здесь написано, что содержание обзора тесно связано с темой работы. Тема исследования автором раскрыта полностью и это свидетельствует о знании автором изучаемой проблемы, об умении систематизировать и критически анализировать научные данные. Написан обзор грамотным, лаконичном языком, проиллюстрирован схемами из цитируемых работ. Нет претензий к Материалам и методам. Раздел Результаты - шесть частей, тоже достаточно всё хорошо. Результаты, полученные в работе, являются базой для дальнейших исследований молекулярных механизмов взаимной регуляции процессов морфогенеза. Принципиальных замечаний по представленной работе нет. Можно отметить не вполне удачные обороты речи, орфографические ошибки в тексте.

Имеется несколько моментов, которые требуют пояснения. Первое, большинство экспериментов с зародышами проводились в условиях подавления трансляции *zuxin*. Только на рисунке 13 представлены данные экспериментов с повышением уровня экспрессии *zuxin*. Интересно что, при этом количество транскриптов *rou5f3.3* уменьшилось лишь в два раза, в то время как при нокдауне *zuxin* в опытных образцах количество мРНК увеличилась на порядок. Чем можно объяснить такой незначительный эффект от повышения уровня экспрессии *zuxin*? Второе, предпринимались ли попытки изучать влияние нокдауна *zuxin* на работу эндогенного промотора гена *rou5f3.3*? Это можно было бы сделать, измерив уровне РНК полимеразы на промоторе в хроматиновой иммунопреципитации или несплайсированного транскрипта этого гена. Эксперименты с люциферазным тестом и влиянию актиномицина D подтверждают гипотезу автора, но не исключают полностью участие *Zuxin* в регуляции транскрипции гена *rou5f3.3*. Возможно влияние является достаточно слабым.

Но указанные замечания ни в коей мере не снижают положительного впечатления. Работа соответствует требованиям ВАК к кандидатским работам. Работа соответствует специальности 1.5.3 - молекулярная биология. А сам, автор, несомненно, заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по этой специальности. Подписано: доктор биологических наук профессор, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов в развитии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук Шидловский Юлий Валерьевич.

Ефремов Роман Гербертович: Спасибо. Елена Анатольевна, ответьте, пожалуйста, на прозвучавшие замечания.

Паршина Елена Анатольевна: Первый вопрос про то, почему при оверэкспрессии *zuxin* так сильно не меняется экспрессия *rou5f3.3* и других генов. Действительно, мы это наблюдали. И не только. Мы также, когда получали NGS, и оверэкспрессированные зародыши тоже смотрели, но при этом также там не наблюдалось изменение экспрессии каких-то генов. И мы предполагаем, что это происходит из-за того, что *Zuxin* очень много в клетке. И, если мы добавим его ещё больше, поэтому не возникает никаких изменений. Но если мы его уменьшаем, то, соответственно, наблюдаем изменения. И второй вопрос

про попытки изучить влияние нокдауна *zuxin* на работу эндогенного промотора гена *rou5f3.3*. Да, мы только проводили люциферазные тесты, а на эндогенном промоторе мы этого не делали, но я благодарна Юлию Валерьевичу за предложенные подходы. И всё.

Ефремов Роман Гербертович: Спасибо. Так, коллеги, теперь я предлагаю перейти к общей дискуссии по работе Елены Анатольевны. Кто хотел бы высказаться? Так сказать, в обсуждении высказать своё мнение об этой работе... Да, Юрий Борисович, пожалуйста.

Лебедев Юрий Борисович: Мне показалось, что нехорошо оставлять без дискуссии такую замечательную работу. Работа замечательна ещё и тем, что хорошо, подробно описан новый молекулярный механизм регуляции активности транскрипционных факторов. Вообще новые молекулярные механизмы регуляции, как бы то ни было - нечастый предмет кандидатских диссертаций. А здесь это выражено и представлено очень скрупулёзно и дотошно с большими далеко идущими последствиями. Я хотел бы ещё подчеркнуть только вот эти возможные последствия: содержание работы не ограничивается только ранними стадиями эмбриогенеза позвоночных (*Xenopus laevis*), то что партнёром *Zuxin* основным, главным был найден функциональный аналог известного транскрипционного фактора Oct4, дает громадные совершенно перспективы исследования этого эффекта регуляции транскрипции в самых разных областях. Oct4 – это один из ключевых игроков в процессах канцерогенеза, процессах иммуногенеза, и вообще созревания на разных стадиях широкого спектра гемопоэтических клеток. Ну и чтобы всё-таки как-то укладываться во временные рамки, я хочу закончить тем, что я абсолютно искренне с чистым сердцем и под большим впечатлением от заслушанного доклада призываю проголосовать за диссертацию. Спасибо.

Ефремов Роман Гербертович: Спасибо, Юрий Борисович, ваша позиция понятна. Призыв воспринят. Так, коллеги, кто ещё хотел бы высказаться о работе? Ну уже достаточно много мы обсуждаем сегодня. Тогда, Елена Анатольевна, Вам представляется возможность для заключительного слова.

Паршина Елена Анатольевна: Я благодарю моего, в первую очередь, моего научного руководителя - Мартынову Наталью Юрьевну. Для меня Наталья Юрьевна является таким примером идеального научного руководителя, поскольку она всегда даёт возможность и самостоятельной организации работы, планировать самой эксперименты и так далее. Но при этом никогда не оставляет в непонятных ситуациях, то есть она всегда готова обсудить, всё отработать вместе. И в общем, я очень рада тому, что Наталья Юрьевна - мой научный руководитель. Ещё благодарю Андрея Георгиевича Зарайского - это руководитель нашей лаборатории за предоставленную мне возможность работать в биологии развития и фундаментальной науке, потому что мне кажется, что для меня - это самая интересная область науки, как происходит эмбриональное развитие. И я рада, что могу прикоснуться к этому. И благодарю всех сотрудников нашей лаборатории за помощь, поддержку и теплую атмосферу. Также я благодарна моим оппонентам Дмитрию Николаевичу и Юлию Валерьевичу за то, что они внимательно посмотрели работу и за их замечания и вопросы, и предложения, и очень ценно для меня это. Ещё благодарю людей, которые помогали мне в работе с другими модельными объектами — это клетки и *Danio rerio*. С клетками мне помогала работать Фатима Константиновна Гиоева. Она из Института белка РАН. И если бы не её помощь, то этой части работы, вообще, я думаю, не было. И я благодарна так же сотрудникам нашего института Арине Шохиной и Дмитрию Староверову за помощь в работе с *Danio rerio*. Всем спасибо!

Ефремов Роман Гербертович: Спасибо большое. Уважаемые коллеги, на этом мы заканчиваем заседание и переходим к тайному голосованию. Просьба проголосовать. А во время подсчёта голосов мы рассмотрим проект и заключение по обеим диссертациям. Спасибо.

(Проводится тайное голосование)

Ефремов Роман Гербертович: Так пока идёт подсчёт голосов, уважаемые члены совета, если у кого комментарии, замечания по проектам заключений по обеим диссертационным работам? Вот Николая Владимировича Бовина сегодня нет, поэтому без него нам трудно сформулировать какие-то пожелания и стилистические правки. Ну может быть есть у кого какие-то предложения? Не вижу. Тогда предлагается принять проекты заключений, которые у всех членов совета на руках. Кто за то, чтобы принять эти проекты заключений? Против? Воздержался? Принято единогласно. Спасибо.

Так, коллеги, минуточку внимания.

Олейников Владимир Александрович: *(оглашает итоги тайного голосования)* Да, спасибо, счётная комиссия закончила свою работу. Паршина Елена Анатольевна. Присутствовало на заседании 20 членов совета, роздано бюллетеней - 20, оказалось в урне - 20, за – 20, против, недействительных – нет.

Ефремов Роман Гербертович: Спасибо, Владимир Александрович. Уважаемые коллеги, прошу утвердить протокол счётной комиссии открытым голосованием. Кто за? Против? Воздержался? Принято единогласно. Поздравляем и на этом разрешите завершить наше сегодняшнее заседание. Всем спасибо.

Заместитель председателя
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремов

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. В.А. Олейников