

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 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 (ИБХ РАН),
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____
решение диссертационного совета от 6 декабря 2023 года № 28

О присуждении **Григорову Артему Сергеевичу** ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Роль малых регуляторных РНК микобактерий в адаптации к стрессам» по специальности «1.5.3 – Молекулярная биология» принята к защите 28 сентября 2023 г. (протокол заседания №21) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10, и действующим на основании Приказов Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Григоров Артем Сергеевич, 25 января 1995 года рождения, в 2018 году окончил биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова по специальности «Биоорганическая химия», в 2022 году окончил аспирантуру Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по направлению подготовки «биологические науки». В настоящий момент работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории регуляторной транскриптомики отдела геномики и постгеномных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Диссертационная работа выполнена в лаборатории регуляторной транскриптомики отдела геномики и постгеномных технологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель - доктор биологических наук Ажикина Татьяна Леодоровна, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, главный научный сотрудник и заведующая лабораторией регуляторной транскриптомики отдела геномики адаптивного иммунитета

Официальные оппоненты:

Кубарева Елена Александровна, доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник, отдел химии нуклеиновых кислот, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федеральное государственное бюджетное учреждение науки высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» и **Мокроусов Игорь Владиславович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства», в своем положительном отзыве, подписанном руководителем лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, кандидатом биологических наук Шитиковым Егором Александровичем и утвержденным генеральным директором ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, членом-корреспондентом РАН, доктором биологических наук Лагарьковой Марией Андреевной, указала, что диссертация Григорова Артема Сергеевича «Роль малых регуляторных РНК микобактерий в адаптации к стрессам» соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (в ред. Постановлений Правительства от: 21.04.2016 г. №335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 №650, 28.08.2017 №1024, от 01.10.2018 №1168, от 20.03.2021 № 426, 11.09.2021 №1539; 26.09.2022 №1690, от 26.01.2023 №101 с изм., внесенными Постановлением Правительства РФ от 26.05.2020 №751), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Соискатель имеет 6 опубликованных работ по теме диссертации объемом 9,5 печатных листов в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы Scopus и Web of Science). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах.

Научные работы по теме, в которые Григоров А.С. внес основной либо существенный вклад, включают:

1. Grigorov A.S., Skvortsova Y.V., Bychenko O.S., Aseev L.V., Koledinskaya L.S., Boni I.V., Azhikina, T.L. Dynamic Transcriptional Landscape of Mycobacterium smegmatis under Cold Stress // International Journal of Molecular Sciences, 2023, Vol. 24, No. 16, P. 12706.
2. Martini B.A., Grigorov A.S., Skvortsova Y.V., Bychenko O.S., Salina E.G., Azhikina T.L. Small RNA MTS1338 Configures a Stress Resistance Signature in Mycobacterium tuberculosis // International Journal of Molecular Sciences, 2023, Vol. 24, No. 9, P. 7928.

3. Grigorov A., Bychenko O., Salina E.G., Skvortsova Y., Mazurova A., Skvortsov T., Kaprelyants A., Azhikina T. Small RNA F6 Provides Mycobacterium smegmatis Entry into Dormancy // International Journal of Molecular Sciences, 2021, Vol. 22, No. 21, P. 11536.

4. Bychenko O., Skvortsova Y., Ziganshin R., Grigorov A., Aseev L., Ostriuk A., Kaprelyants A., Salina E.G., Azhikina T. Mycobacterium tuberculosis Small RNA MTS1338 Confers Pathogenic Properties to NonPathogenic Mycobacterium smegmatis // Microorganisms, 2021, Vol. 9, No. 2, P. 414.

5. Salina E.G., Grigorov A., Skvortsova Y., Majorov K., Bychenko O., Ostriuk A., Logunova N., Ignatov D., Kaprelyants A., Apt A., Azhikina T. MTS1338, A Small Mycobacterium tuberculosis RNA, Regulates Transcriptional Shifts Consistent With Bacterial Adaptation for Entering Into Dormancy and Survival Within Host Macrophages // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019, Vol. 9, P. 405.

6. Salina E.G., Grigorov A.S., Bychenko O.S., Skvortsova Y.V., Mamedov I.Z., Azhikina T.L., Kaprelyants A.S. Resuscitation of Dormant “Non-culturable” Mycobacterium tuberculosis Is Characterized by Immediate Transcriptional Burst // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2019, Vol. 9.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н. **Мокроусова Игоря Владиславовича**. Отзыв **положительный**, содержит замечания стилистического и технического характера, а также следующие вопросы:

1) Как холодовой стресс влияет на общую физиологию и метаболизм бактерий, и есть ли данные о долгосрочных адаптациях к низким температурам? Идентифицированы ли конкретные белки или пути сигнализации, которые активируются или подавляются при холодовом стрессе?

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

3) Имеются ли данные о том, как изменения в экспрессии идентифицированных генов, которые происходят при гиперэкспрессии MTS1338, коррелируют с изменениями в физиологии и поведении бактерий?

Отзыв официального оппонента д.х.н. проф. **Кубаревой Елены Александровны**. Отзыв **положительный**, содержит следующие вопросы и замечания:

1) Хотелось бы понять, насколько данные о роли нкРНК (в частности F6), полученные для *Mycobacterium smegmatis* могут быть экстраполированы на *Mycobacterium tuberculosis*. Было бы полезным привести данные по сравнению тех участков геномов этих бактерий, которые могут быть вовлечены во взаимодействие с нкРНК.

2) В разделе 3.2.4. проводится оценка транскрипции гена нкРНК F6 в условиях кислого и окислительного стрессов методом нозерн-блоттинга. В тексте не поясняется, почему для оценки выбрана именно средняя логарифмическая фаза роста штамма MSM_WT. Возможно, в других фазах роста отличия в эффективности транскрипции в нормальных условиях и в условиях стрессов были бы более существенными.

3) В подписи к рис. 33 (стр. 90), на котором приведена оптическая плотность жидких культур штаммов MSM_WT и $\Delta F6$ *M. smegmatis*, измеренная в условиях окислительного стресса, а также в тексте не указано в какой фазе роста были отобраны пробы. Концентрация перекиси водорода в подписи к рисунку составляет 500 мкМ, а в разделе 2.15 (стр. 53, глава «Материалы и методы») 5 мкМ. Какое из значений является верным?

4) В разделе 2.17. главы «Материалы и методы» автору следовало бы указать, что эксперименты с мышами проводилась не им, а сотрудниками ЦНИИ туберкулеза с указанием их фамилий.

5) В работе имеются опечатки и ряд недочетов:

- Англицизмы – характеристика, секвестрация, рестрицировали.

- Некорректным является термин фосфатно-солевой буфер. Следовало бы указать, какой именно буфер использовали – натрий- или калий-фосфатный и pH раствора.

- В Приложениях Л, С, У, Ф белки (продукты) и их функции должны быть указаны по-русски.

Отзыв **ведущей организации**. Отзыв **положительный**, без принципиальных замечаний, содержит ряд дополнений:

1) Обзор литературы начинается с описания подходов по поиску нкРНК, 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.

2) 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.

3) Для описываемых нкРНК не хватает информации о локализации в геноме (позиции на референсных геномах).

4) Автором приводится информация о времени адаптации *M. smegmatis* к холодному стрессу, однако результаты не сравниваются с кривыми роста бактерии без стресса, что было бы более наглядно.

5) Следующее замечание, возможно, будет являться продолжением работы: интересно было бы увидеть наличие/отсутствие описываемых нкРНК среди всего разнообразия геномов микобактерий.

Отзыв на автореферат к.б.н., с.н.с. группы редактирования геномов микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнология РАН **Шумкова Михаила Сергеевича**. Отзыв **положительный**, не содержит замечаний.

Отзыв на автореферат к.б.н., с.н.с. лаборатории иммуногенетики ЦНИИ Туберкулеза Линге Ирины Андреевны. Отзыв **положительный**, не содержит замечаний.

Отзыв на автореферат к.х.н., н.с. центра молекулярной и клеточной биологии Сколтех Бурениной Ольги Юрьевны. Отзыв **положительный**, не содержит замечаний.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области молекулярной биологии и микробиологии, которые подтверждены их многочисленными публикациями в ведущих российских и международных научных журналах. Е.А. Кубарева – признанный специалист в области изучения нуклеиновых кислот, в том числе и бактериальных некодирующих РНК. И.В. Мокроусов и сотрудники ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального Медико-биологического Агентства» внесли значительный вклад в исследование микобактерий, особенно в контексте болезнетворных штаммов и их влияния на здоровье человека. Их исследования охватывают широкий спектр аспектов, от молекулярной идентификации до разработки новых методов лечения и профилактики заболеваний, вызванных микобактериями. Эти достижения делают их идеальными кандидатами для оценки научной новизны и практической значимости диссертационной работы, предоставляя глубокий анализ и конструктивную критику, способствующие дальнейшему развитию и усовершенствованию исследований в данной области.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований был впервые описан набор из 56 малых регуляторных РНК *M. smegmatis*, которые предположительно участвуют в адаптации к холодовому стрессу; выявлены функции, молекулярная мишень и механизм действия малой регуляторной РНК *M. smegmatis* F6; определен триггер экспрессии *ex vivo* малой РНК *M. tuberculosis* MTS1338; выявлено, что гиперэкспрессия MTS1338 в *M. tuberculosis* повышает выживаемость рекомбинантного штамма в условиях разных стрессов и регулирует экспрессию ряда генов, связанных с процессами адаптации; гетерологичная транскрипция MTS1338 в непатогенной бактерии *M. smegmatis* приводит к повышению выживаемости рекомбинантного штамма при инфекции *ex vivo*, замедляет созревание фаголизосом и модулирует экспрессию ряда цитокинов, а также приводит к изменению протеомного и секретомного профилей самой бактерии.

Теоретическая значимость исследования заключается в том, что полученные в ходе работы данные существенно расширяют представление о роли малых регуляторных РНК в адаптации микобактерий к стрессовым условиям, а также обогащают знания о молекулярных механизмах регуляции генной экспрессии в этих организмах.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что описанные в работе свойства малой РНК MTS1338 делают её перспективной мишенью для разработки терапевтических подходов, альтернативным существующим, а выявленные новые некодирующие РНК микобактерий могут быть применены для развития методов диагностики.

Достоверность результатов проведенного исследования сомнений не вызывает. Исследования проведены с помощью широкого спектра современных методов и подходов, включающих молекулярно-биологические, биохимические подходы, а также передовые

методы транскриптомики и биоинформатического анализа. Выводы и научные положения, сформулированные в диссертации, логично вытекают из полученных данных.

Личный вклад соискателя состоит в активном участии на всех этапах выполнения диссертационной работы. Разработка концепции исследования проводилась автором совместно с научным руководителем, д.б.н. Ажикиной Т.Л. Автором были полностью выполнены следующие этапы исследования: анализ научной литературы по теме исследования; разработка дизайна исследования; получение генно-инженерных конструкций, создание рекомбинантных и мутантных штаммов микобактерий; подготовка библиотек и биоинформатический анализ данных секвенирования; проведение экспериментов по выживанию микобактерий в условиях стрессов и при заражении макрофагов. В рамках научной коллаборации отдельные разделы работы выполнены совместно с сотрудниками лаборатории иммуногенетики Центрального научно-исследовательского института туберкулёза под руководством А.С. Апта (заражение мышей) и с сотрудниками группы биохимии адаптации микроорганизмов Института биохимии имени А.Н. Баха под руководством Е.Г. Салиной (культивирование *M. tuberculosis*).

Диссертационный совет 24.1.037.01 заключил, что диссертационная работа Григорова Артема Сергеевича является законченной научно-квалификационной работой, в которой были существенно расширены представления о роли малых регуляторных РНК микобактерий в адаптации к стрессам.

Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты и по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3. – Молекулярная биология. Таким образом диссертационная работа Григорова Артема Сергеевича «Роль малых регуляторных РНК микобактерий в адаптации к стрессам» представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. – Молекулярная биология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; № 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101).

Соискатель Григоров Артем Сергеевич ответил на задаваемые в ходе заседания вопросы и привел собственную аргументацию:

Вопрос 1: как вы предсказывали мишени малых РНК? И есть ли структурные данные о комплексах малых РНК и мРНК, как именно происходит взаимодействие данных молекул?

Ответ: Природа комплекса – это взаимодействие, которое происходит через короткие одноцепочечные участки, в случае транс-кодируемых РНК это 6-12 нуклеотидов. Само взаимодействие предсказывается с помощью программ-

предсказателей, которые анализируют последовательности и вторичные структуры малых РНК и мРНК. Структур таких комплексов не получено.

Вопрос 2: есть ли доказательство такого РНК-РНК взаимодействия?

Ответ: да, в данном случае мы доказываем, что взаимодействие есть путем внесения мутации в область взаимодействия. Также мы проверяем, что взаимодействие есть с помощью метода *electromobility shift assay*, когда комплекс малой РНК и РНК разгоняется в геле.

Вопрос 3: есть ли статистика какая доля заражений происходит при непосредственном контакте, когда не происходит адаптации бактерии к стрессам, и какая доля происходит адаптированными бактериями?

Ответ: нет, такой статистики нет. Могу сказать, что есть данные о том, что латентная форма туберкулеза есть у каждого третьего или четвертого человека на земле, а в активную форму она переходит примерно в 10% случаев. Также можно сказать, что микобактерии *M. tuberculosis*, попавшие в окружающую среду сохраняют высокий инфекционный потенциал, так как они очень устойчивы к различным стрессам и переживают даже кипячение.

Вопрос 4: вы устраиваете стресс бактериям, они отвечают на него регуляторными РНК. А какое есть связующее звено между стрессом и изменением экспрессии малых некодирующих РНК? Что являются сенсором?

Ответ: это могут быть двухкомпонентные системы, у *M. tuberculosis* известными примерами являются DosR и ProPR. В случае DosR одним из таких сигналов является гипоксия, сигнальная молекула к клеточной стенке активируется, передает сигнал на транскрипционный фактор, который запускает транскрипцию малых РНК.

Вопрос 5: вы показываете, что одна из ваших РНК зависит от интерферона-гамма, в то время как другая РНК уровень интерферона гамма понижает, не могли бы вы прокомментировать это?

Ответ: уровень экспрессии MTS1338 в условиях заражения *ex vivo* действительно зависит от интерферона-гамма. При этом, MTS1338 при гетерологичной транскрипции в бактерии, у которой нет гена этой малой РНК, приводит к модуляции экспрессии других цитокинов, не интерферона-гамма.

Вопрос 6: каков механизм активации устойчивости к холодовому стрессу?

Ответ: так как низкие температуры – это комплексный стресс, сам механизм достаточно сложный и нет однозначного ответа о том, как это происходит. Тем не менее один из вариантов заключается в том, что изменяется текучесть мембраны, что влияет на конформацию интегральных белков, некоторые из которых могут участвовать в передаче сигнала. Еще один из механизмов – изменение вторичной структуры РНК. В случае изменения температуры повышается устойчивость некоторых РНК, которые при более высоких температурах быстрее деградируют и соответственно повышается экспрессия белков, влияющих на адаптацию. Одним из самых известных примеров подобного способа регуляции является мРНК белка холодового шока CspA *E. coli*.

На заседании 6 декабря 2023 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по изучению роли малых регуляторных РНК микобактерий в адаптации к стрессам присудить Григоров Артему Сергеевичу ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 6 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3 – Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, действительных бюллетеней – 0.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
Диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

7 декабря 2023 г.

