



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ИМ. АКАДЕМИКОВ М.М. ШЕМЯКИНА И Ю.А. ОВЧИННИКОВА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

СТЕНОГРАММА

заседания диссертационного совета 24.1.037.01

15 февраля 2023 года

Защита диссертации **Ларионовой Татьяной Дмитриевной** на тему:
«Сравнительный анализ изоформ рибосомального белка RPL22L1 в
регуляции фенотипа клеток глиобластомы»,

представленной на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Специальность 1.5.3 – Молекулярная биология

Москва – 2023 г.

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 15 февраля 2023 года.

Зам. председателя диссертационного совета
доктор физико-математических наук

Р.Г. Ефремов

Учёный секретарь диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Олейников

Из 30 членов совета присутствует 20 человек, из них докторов по профилю диссертации – 6.

1.	Д.ф.-м.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
2.	Д.ф.-м.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
3.	Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
4.	Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
5.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(1.5.6)
6.	Д.х.н.	Генералова Алла Николаевна	(1.5.6)
7.	Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(1.4.9)
8.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
9.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Завриев Сергей Кириакович	(1.5.6)
10.	Д.б.н.	Зарайский Андрей Георгиевич	(1.5.3)
11.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
12.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
13.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
14.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
15.	Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(1.4.9)
16.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
17.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(1.4.9)
18.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(1.4.9)
19.	Д.х.н.	Шапаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
20.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Мы начинаем работу. Очередное заседание нашего диссертационного совета. Сегодня у нас в программе две защиты, две кандидатские диссертации. Первая защита кандидатской диссертации Ларионовой Татьяны Дмитриевны «Сравнительный анализ изоформ рибосомального белка RPL22L1 в регуляции фенотипа клеток глиобластомы» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология. Научный руководитель – доктор химических наук Шапаронов Михаил Иванович и научный консультант – доктор биологических наук Павлюков Марат Самвелович. Официальные оппоненты – Бойчук Сергей Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент академии наук Республики Татарстан, зав. Кафедрой общей патологии Казанского государственного медицинского университета Минздрава России. Оппонент отсутствует по уважительной причине. Еще один оппонент – Егоров Егор Евгеньевич, доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник

клеточных основ развития злокачественных заболеваний Института молекулярной биологии им. Энгельгардта Российской академии наук. Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава Российской Федерации. Владимир Александрович, расскажите, пожалуйста.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович: Да, материалы личного дела... Ларионова Татьяна Дмитриевна. Гражданка Российской Федерации. Окончила в семнадцатом году магистратуру Московского Технологического Университета, это то, что МИТХТ ранее им. Ломоносова, по направлению «Биотехнология». С 17 до 19 года – лаборант-исследователь. С 19-го – младший научный сотрудник мембранных биоэнергетических систем ИБХ РАН. С 17 по 21 г. обучалась в аспирантуре нашего института. Кандидатский экзамен по специальности молекулярная биология - «отлично». Работа выполнена в лаборатории мембранных биоэнергетических систем ИБХ РАН. Научный руководитель, как уже было сказано – Михаил Иванович Шахпаронов, научный консультант – Марат Самвелович Павлюков, доктор биологических наук. По теме диссертации опубликовано шесть статей в рецензируемых журналах. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК вовремя, а именно 8 декабря 22 года и все необходимые документы в «деле» имеются.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Уважаемые присутствующие, есть вопросы по личному делу соискателя? Вопросов нет. Тогда, Татьяна Дмитриевна, пожалуйста, изложите основные положения вашей работы. Регламент – 20 минут.

Соискатель (Ларионова Т.Д.): *(излагает основные положения диссертационной работы).*

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Спасибо. Так, уважаемые коллеги, пожалуйста, вопросы. Если можно, свет включите, пожалуйста, чтобы видеть публику.... Да, пожалуйста, Дмитрий Александрович. Свет можно, будьте добры? Кто отвечает у нас за освещение?.. Ну ладно, будем слушать тогда, задающих вопросы.

Д.б.н., Долгих Дмитрий Александрович: Про сам белок было сказано очень мало. Что за белок, какова его структура, может быть, доменная структура, может быть есть какие-то данные? Если доменная структура есть, как они, так сказать, связаны с функцией? Вот не можете немножко про белок, пожалуйста, расскажите.

Соискатель (Ларионова Т.Д.): RPL22L1 является паралогом рибосомного белка RPL22, гомология их составляет примерно 70%. Это если мы говорим про а-изоформу, вот про В-изоформу у нас, соответственно, гомология меньше. Не так много данных относительно структуры RPL22L1, известно, что он является компонентом рибосомы, при этом он является не обязательным компонентом рибосомы, т.е. может присутствовать, может не присутствовать, вот. Относительно доменной структуры, у меня уже спрашивали этот вопрос, но к сожалению, какой-то информации мне не удалось по его структуре, т.е. те структуры, которые представлены в базах данных..., т.е., я имею в виду структуры рибосомы, в них в основном присутствует RPL22, т.е., паралог этого белка. Вот, поэтому я могу предположить только, что так как эти белки в общем-то взаимозаменяемы в рибосоме, то связывание RPL22L1 также происходит в этой зоне, но в целом это хороший вопрос для изучения, спасибо Вам за него большое, вот. Мы об этом в том числе думаем, чтобы продолжить эту тему вот в эту сторону. Спасибо.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Так, коллеги, еще вопросы. Да, пожалуйста.

Д.м.н. Штиль Александр Альбертович: Спасибо большое. И несколько, может, коротких вопросов. Скажите пожалуйста, гетерогенность рибосом частое биологическое явление?

Соискатель (Ларионова Т.Д.): Я предполагаю, что в целом да. Почему я предполагаю... Гетерогенность рибосом была обнаружена в 2017 году. Вот так вот прямо о ней ярко заявили и с тех пор, конечно, стали исследовать все больше и больше это явление на разных клетках... А к настоящему моменту было обнаружено, что, да, рибосомы гетерогенны как в тканях человека мышей и также растений, дрожжей, вот. На счет бактерий, к сожалению, не скажу, поэтому в целом я думаю, что да, это достаточно распространенное явление и сейчас идет активное изучение... его активное изучение.

Д.м.н. Штиль Александр Альбертович: Насколько надежно разделение коровых и периферийных клеток в глиобластоме, которая сама по себе очень разная, а на этом строятся рассуждения и эксперименты?

Соискатель (Ларионова Т.Д.): Да, спасибо большое за этот вопрос. Э, мы старались как можно провести, ну так как бы как можно четче выделять эти клетки. Сейчас я вам покажу, извините за эту картинку..., непосредственно опухоль, которую мы получаем от пациентов, т.е. мы выделяем коровые клетки, это именно из зоны некротической, т.е. стараемся брать те области, которые для начала, визуально похожи на некротические области, кроме того, медики нам сообщают, какая часть какой зоне соответствует, ..краевая область это вот отсюда, вот собственно, тот кусочек, который мы отсюда вырезали, т.е. он максимально приближен к внешнему виду нормального мозга, но и, кроме того, впоследствии мы стараемся охарактеризовать эти клетки с помощью различных маркеров на коровые и на краевые. Вот, поэтому ну вот как бы большего нам молекулярная биология не предоставили к сожалению.

Д.м.н. Штиль Александр Альбертович: Понятно. И короткий вопрос про будущее. Кто из протеинтиназ кандидат на регуляцию SRFs4?

Соискатель (Ларионова Т.Д.): Ну мы предполагаем, что это киназы семейства CLK, ну CLK1/4, вероятно, именно они.

Д.м.н. Штиль Александр Альбертович: Спасибо.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Так, коллеги, еще есть вопросы?

Уч. секретарь, д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович: А можно еще я тоже тогда.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Да, конечно.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович: Да... вот вы здесь пишете, что обнаружен новый ингибитор сплайсинга, а вот даже вы в речи сказали: найден, а вот какие варианты, вот что предшествовало, почему именно такой?

Соискатель (Ларионова Т.Д.): Ну, собственно, этот ингибитор был найден нами благодаря коллаборации с Александром Альбертовичем Штилем. Он предоставил нам несколько веществ, которые они исследовали со своими коллегами для тестирования на

клетках глиобластомы. Вот, ну и собственно мы смотрели эти вещества, а также те вещества, которые уже известны как устоявшиеся ингибиторы сплайсинга, вот, и обнаружили, что среди исследуемых веществ вот именно FG мы решили как бы решили посмотреть а что и с нашим белком будет происходить в ответ на обработку этим соединением и вот к счастью обнаружили, что сплайсинг его меняется. Поэтому предыстория вот такая. А?

Д.б.н. Завриев Сергей Кириакович: механизм действия?

Соискатель (Ларионова Т.Д.): механизм...а, механизм действия, ну, это тоже требует дальнейшего более тщательного изучения, но изначально это соединение как раз, мм... синтезировалось в качестве ингибитора киназ сплайсособных белков, вот и мы предполагаем, что оно входит в TF связывающий карман киназ сплайсособных белков, вот в частности киназ семейства CLK, эти киназы как раз отвечают за фосфорилирование белков семейства SRSF. Вот, соответственно, FG259 связывается с киназами и нарушает их работу и нарушается фосфорилирование этих факторов сплайсинга. Соответственно сплайсинг, ну... меняется в ответ на это, нарушается.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: так, коллеги, я тоже тогда позволю себе задать вопрос. Вопрос – правильно ли я понимаю, что вот В-изоформа не является по сути рибосомальным белком раз она в ядро проникает и совершенно отличается очень сильно от А-изоформы, вот почему её по-прежнему нету у неё какого-то другого названия, да и вот она не входит в структуру рибосомы я так понимаю?

Соискатель (Ларионова Т.Д.): Да, спасибо за вопрос. Да, она действительно не входит в рибосому и обладает вот внерибосомными функциями, расположена в ядре, регулирует сплайсинг. Вот, но эту рибосому, её обнаружили мы, поэтому данных литературных о ней не встречается вообще, вот, т.е. до нас было известно, что существует белок RPL22L1 и все, без деления на изоформы. Все исследования проводились, соответственно вот на таком белке, а, тем не менее, в литературе можно встретить вот такие, в старой литературе, противоречивые данные, что то этот белок входит в рибосому, то, как раз в 17ом году, они показали, что может участвовать и в регуляции сплайсинга, но не могли понять с чем это связано и почему это так, вот. Мы немножко поучаствовали в этом.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: да, но данных по структуре, по механизмам по-прежнему вот не хватает сильно, на мой взгляд, но это не цель, наверное, вашей работы, но, просто, та же а-изоформа, вы говорите, что она не является необходимым компонентом в структуре рибосомы, а какой тогда механизм действует, как она влияет на трансляцию?

Соискатель (Ларионова Т.Д.): Ну, мы предполагаем, что, включаясь в состав рибосомы, она...эээ, привлекает к трансляции те или иные молекулы RNK, потому что, ну, рибосомный белок она может взаимодействовать.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: А что значит «привлекает»? У неё есть какие-то сайты специфического связывания с какими-то фрагментами нуклеиновых кислот или, ну какой с точки зрения молекулярной структуры, механизм может быть?

Соискатель (Ларионова Т.Д.): аа, да, у них есть РНК-связывающий мотив, у неё, в её структуре, вот, но, соответственно, за счет него, вероятно, она их и привлекает.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: но это предположение ваше, да?

Соискатель (Ларионова Т.Д.): Да, но это... да.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Но вы этим вопросом не занимались?

Соискатель (Ларионова Т.Д.): нет, мы не изучали, но тут много чего мы можем изучить и, я думаю, мы будем продолжать в этом направлении.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Ну, просто, очень много интересных, на мой взгляд, это чисто моя точка зрения, интересных экспериментальных данных, но они, такие, феноменологические, т.е. мы видим это, регистрируем с такой-то степенью достоверности, вот, но попытки объяснить с точки зрения молекулярной структуры не ставились в качестве задачи, да у вас?

Соискатель (Ларионова Т.Д.): Нет.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: То есть это не ваша работа. И еще один вопрос. Вы сказали, что брали пробы из зон с низким значением рН и с там нормальным, повышенным значением рН, вот на сколько точно вы можете контролировать такое вот локальное значение рН, потому что... ну это динамическая такая величина, которая там может зависеть от очень многих условий и с каким временным... пространственно-временным разрешением вы можете вот этот анализ, результаты этого анализа контролировать?

Соискатель (Ларионова Т.Д.): спасибо за этот вопрос. Вопрос, на самом деле, сложный потому что, ну, понятно, что биопсии брала не я, а медики. Есть у них специальный режим сканирования в МРТ, который позволяет, вот, выделить, зоны с закисленным и нормальным Ph. Определение этих зон основано на миграции протона, так как среда закисленная, то повышенное содержание протонов, вот и на скорость его взаимодействия с аминокислотами т.е. протонирование и де-протонирование вот прибор детектирование вот это вот, т.е., соответственно чем больше там протонов, тем прибор определяет, что это более кислая среда. На самом деле есть определенный параметр, который позволяет говорить о кислотности это вот это вот значение. Вот эта вот величина, ну вот вот эта вот... МТРасим, но в его вычислении используется очень сложная формула и в общем это делает программа... вот, а на счет точности, но в целом хирургия позволяет достаточно точно выделять область, брать биопсии из зон с Ph, но мы старались и просили, чтобы медики брали те зоны, которые, вот, были максимально опухолевыми, но максимально кислыми или максимально возможно не кислыми, поэтому мы надеемся, что они это, в общем, сделать.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Ну, вот этот рисунок с графиками выглядит очень странно. Тем более вы говорите о коэффициенте корреляции линейном для выборок из двух элементов, т.е. кривые построены по двум точкам и вы говорите о коэффициенте корреляции. Зачем это показывать, но это моё личное мнение, спасибо.

Соискатель (Ларионова Т.Д.): Спасибо.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Так, коллеги, если больше вопросов нет, я не вижу, тогда слово предоставляется. Спасибо, вы пока присаживайтесь... да, научному руководителю. Михаил Иванович, пожалуйста.

Научный руководитель, д.х.н. Шапаронов Михаил Иванович: Могу сказать только все в превосходных тонах, потому что, вообще, так сказать, явление, что молодые ученые в нашем институте, доводящие работы до более-менее логического какого-то завершения...и довольно приличные работы, даже по нашим меркам, вот, они достойны уважения. Это раз. Большой вклад в это внесло сама обстановка в нашей лаборатории, в нашем отделе, потому что у нас очень дружный коллектив и очень молодой. Ну и несомненно, конечно, со-руководительство с Маратом Самвеловичем Павлюковым тоже наложило свой отпечаток. Он, в общем-то. Довольно талантливый товарищ, ученый и так далее. Вот. Ну, на основании всего этого, много можно говорить еще, я, конечно, призываю голосовать положительно. Спасибо вам большое!

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Спасибо. А Марат Самвелович здесь? Не хотел он что-нибудь добавить? Ну я не вижу. Ну, Михаил Иванович тогда все сказал, будем считать. Спасибо. Так, Владимир Александрович, пожалуйста, вам слово.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович: *(Излагает заключение организации, где выполнялась диссертация)* Да, теперь речь пойдет о заключении. Во-первых, заключение организации, где выполнялась работа. А выполнялась работа в лаборатории мембранных биоэнергетических систем нашего института. Это Отдел функционирования живых систем. Соответственно, вот заключение у меня в руках. Ну, конечно, здесь биографические данные, когда там окончила и как работала. Значит, важно: тема диссертационной работы утверждена ученым советом еще двадцатого декабря семнадцатого года. Далее речь идет об актуальности. Ну понятно, глиобластома — наиболее опасная форма рака головного мозга, там есть соответствующие проблемы... Ну и в частности.. вот здесь прямо пишется: роль альтернативного сплайсинга пре-мРНК в регуляции функционирования рибосом в глиобластоме до сих пор остаётся загадкой. В связи с этим не вызывает сомнений актуальность данного исследования. И научная новизна вот опять же, слова: впервые проведено исследование, в данной работе экспериментов... были определены функции изоформ, определен механизм, с помощью которого образуется изоформа RPL22L1b, обнаружен низкомолекулярный ингибитор киназ сплайсосомных белков, предложен новый механизм возникновения внутриопухолевой гетерогенности глиобластомы. Теоретическая и практическая важность работы подчеркивается. Соответственно, практическая значимость работы. Степень достоверности: использовались современные методы и подходы и так далее, то есть работы выполнена на высоком научно-методическом уровне. Личное участие: ну, личное участие, во-первых, работы проведены в период с семнадцатого по двадцать второй год, то есть пять лет, в общем, такой продолжительный период. Диссертационная работа соответствует заявленной специальности Молекулярная биология – один пять три и отрасли науки – биологические науки. Ну, естественно, прошла проверку, оригинальность, отсутствие заимствований. Достаточно полно опубликована – это шесть статей. Ну и соответственно, работа рекомендуется к защите. Это принято на заседании семинара Отдела функционирования живых систем нашего института. Присутствовало тридцать девять человек. Подписано – секретарь семинара Михура, Зам. председателя Донцова Ольга Анатольевна, Ямпольский Илья Викторович это дело все подписал. И утверждено директором нашего института академиком Александром Габировичем

Габибовым. Это что касается заключения организации, где выполнена работа. Теперь отзыв.

Отзыв ведущей организации. *(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается)*. Ведущей организацией является учреждение... государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Блохина» Минздрава Российской Федерации. Отзыв полностью положительный. Опять же, начинается с актуальности, о важности борьбы с онкологическими заболеваниями. Ну и, значит, тут пишется: «В настоящее время механизмы, приводящие к возникновению различающихся по свойствам клеток в одном опухолевом очаге, исследованы недостаточно к настоящему времени. В связи с этим, работа Ларионовой, посвященная исследованиям одного из таких механизмов, высоко актуальна». Очень интересно – связь с планами соответствующих отраслей науки. Это я впервые встречаю в заключении. Исследование соответствует задачам мероприятия один два «Проведение проблемно-ориентированных поисковых исследований и создание научно-технического задела по технологиям в области живых систем Федеральной целевой программы исследований и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России». Постановления правительства ссылаются. Новизна. Ну, опять же, здесь встречаются, естественно, выражения: в работе впервые исследован протеом рибосом клетки, установлен молекулярный механизм, регулирующий появление RPL22L1b, обнаружен низкомолекулярный ингибитор. По результатам работы предложил автор новый механизм формирования внутриопухолевой гетерогенности глиобластомы. Структура и содержание работы - по стандартному принципу. Обзор литературы, в целом, обзор литературы написан понятным языком, сложные вопросы изложены на профессиональном уровне. Материалы и методы содержит подробное описание всех исследований. «Результаты и обсуждения» - представлены полученные автором данные о различиях в белковом составе рибосом, которые были выделены из клеток разных зон опухоли. Ну, соответственно, то, что мы слышали здесь... И выводы, вытекающие из представленных данных, полностью отражают существо проведенных исследований. Ну. Соответственно, список литературы включает 183 ссылки, 3 таблицы и 56 рисунков. Значимость: работа имеет два приложения – фундаментальный общебиологический аспект представлен новизной молекулярного механизма регуляции экспрессии генов на уровне трансляции мРНК. С практических позиций значимость результата диссертанта определяется важностью патогенетических особенностей указанной регуляции как мишени терапии высокозлокачественной опухоли глиобластомы. Рекомендации по использованию результатов диссертации здесь описаны. Ну и наконец замечания по диссертационной работе. Несмотря на общую высокую оценку работы, есть некоторые замечания, вопросы и пожелания.

Первое. Рекомендуется провести больше исследований, подтверждающих взаимодействие RPL22L1b с длинной некодирующей РНК MALAT1. Автор детектировала MALAT1 как одну из молекул РНК, связывающихся с RPL22L1b во время РНК-иммунопреципитации. Так как RPL22L1b является РНК-связывающим белком и может взаимодействовать со многими молекулами РНК, необходимо особое внимание уделить подтверждению специфичности такого взаимодействия. В частности, можно выполнить «обратный» эксперимент: иммунопреципитировать белки, взаимодействующие с MALAT1, и установить, есть ли среди его партнеров RPL22L1b. Это первое.

Второе. Хотелось бы рекомендовать автору формулировать выводы более точно. В частности, вывод «Экспрессия RPL22L1b влияет на сплайсинг в клетках глиобластомы за

счет деградации длинной некодирующей РНК MALAT1» (с учетом указанного в пункте один) следует формулировать это как предположение.

Третье. В тексте имеются грамматические ошибки и опечатки.

Но указанные замечания не снижают высокой ценности диссертационной работы.

Ну опять же, подчеркивается, что шесть статей. И в заключение, что эта работа является научно-квалификационной, что она соответствует положениям ВАК, а автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 «Молекулярная биология». Соответственно, обсужден на совместной конференции лаборатории генетики опухолевых клеток в центре Блохина. Подписано ведущим научным сотрудником лаборатории генетики опухолевых клеток ФГБУ НМИЦ онкологии имени Блохина Минздрава России. Подписал доктор биологических наук Шушанов Саин Сакенович. Ну и соответственно, утверждено директором Федерального государственного бюджетного учреждения, это академик РАН Стилиди. Были замечания.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Спасибо. Татьяна Дмитриевна, пожалуйста, ответьте на замечания из отзыва ведущей организации.

Соискатель (Ларионова Т.Д.): Большое спасибо за вопросы и замечания. По поводу специфичности взаимодействия MALAT1 с б-изоформой – я полностью согласна с этим, с этой рекомендацией и нам однозначно стоит более тщательно подтвердить это взаимодействие, то есть да, я думаю, что проведем этот эксперимент и сделаем так как нам рекомендовали, то есть проведем обратную с преципитацию. Относительно замечаний по поводу текста диссертации и формулировки выводов. Большое спасибо за это замечание, я буду работать над тем, чтобы более аккуратно формулировать выводы ну и проводить вычитку теста тоже более тщательно, спасибо.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Спасибо. Так, других письменных отзывов на работу не поступило в диссертационный совет, поэтому мы переходим к обсуждению. Слово предоставляется официальному оппоненту Егорову Егору Евгеньевичу.

Официальный оппонент, д.б.н. Егоров Егор Евгеньевич: *(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается)* Добрый день. Ну, прежде всего, я хотел бы поздравить вообще ИБХ с такой работой. Потому что работа чрезвычайно хорошая, она, конечно не закончена, но такие вещи закончить невозможно, они каждый раз будут открывать все дальше и дальше. Ну поскольку я один оппонент, давайте я просто прочту отзыв. Значит, Представленная Ларионовой Татьяной Дмитриевной работа посвящена проблеме лечения опухолей, в частности, глиобластомы, характеризующейся исключительной интратуморальной гетерогенностью. Было известно, что клетки краевых и центральных зон одной опухоли и той же опухоли различаются. В процессе работы было обнаружены различия в составе рибосом в центре и с краю опухоли. Подсказка в работе возникла при сравнении данных транскриптомного и протеомного анализов. Эти различия были объяснены с помощью альтернативного сплайсинга. Очень кислый pH в ядре опухоли переключает сплайсинг мРНК рибосомного гена RPL22L1 в сторону изоформы RPL22L1b. Это позволяет клеткам выживать при ацидозе, увеличивает стволовость и коррелирует с худшим прогнозом заболевания. Изоформа RPL22L1b ранее не была описана. Выяснилось, что RPL22L1b выполняет внерибосомные функции и участвует в процессинге РНК. RPL22L1b способствует сплайсингу РНК, взаимодействуя с

длинной некодирующей РНК lncMALAT1 в ядре и индуцирует его деградацию. В краевой зоне опухоли, RPL22L1a взаимодействует с рибосомами, стимулируя трансляцию множества специфических мРНК, включая TP53. Увеличивается общий уровень синтеза белка. Было показано, что переключение изоформы RPL22L1 регулируется фактором SRSF4. Экспрессия SRSF4, также, как и RPL22L1b была связана с плохим прогнозом у пациентов с глиобластомой. Было идентифицировано соединение (FG1059), которое ингибирует фосфорилирование SRSF4 и подавляя рост опухоли статистически значимо продлевает жизнь животных. Таким образом, общая цепь событий выглядит следующим образом. Закисление центральной зоны опухоли усиливает экспрессию фактора сплайсинга SRSF4, который переключает сплайсинг пре-мРНК рибосомного белка RPL22L1 в сторону образования изоформы RPL22L1b. Эта изоформа не может связываться с рибосомой из-за измененной структуры С-конца. При этом N-концевая часть сохраняет способность взаимодействовать с молекулами РНК. RPL22L1b вызывает деградацию длинной некодирующей РНК MALAT1. Снижение уровня MALAT1, а также изменения трансляции способствует сдвигу фенотипа в сторону более стволового и агрессивного. Актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, а также степень достоверности полученных результатов не вызывают никаких сомнений. Диссертационная работа содержит все разделы стандартные для работ такого типа. Она содержит 56 рисунков и 1 таблицу, а также 2 таблицы в приложении. Список литературы содержит 183 источников. В работе отражены все необходимые результаты исследования или приведены ссылки на исходные результаты. В диссертации 128 страниц, включая приложения. Несмотря на высокий технический уровень работы к ней есть некоторые замечания.

Замечание первое. Из текста диссертации неясен личный вклад автора. Отсутствуют благодарности и указания на помощь в работе. В оглавлении диссертации приведено описание пятидесяти пяти использованных методов и совершенно ясно, что один человек физически не способен ими владеть. Только из текста автореферата стало ясно, какими методами владеет собственно диссертант.

Ну и дальше мелочь всякая. Например. Слишком большой список сокращений, куда включены всем известные вещи: АТФ, ДНК, РНК, миллилитр, минута. При том, что сама работа суперсложна, такой список просто затрудняет его использование. Есть неточности: ну псевдоуридин назван псевдоуридилированием; Опять же, GBM, который используется в докладе – это glioblastoma multiforme, в тексте по-русски «глиобластома». Ну, видимо, надо было пояснить, что это одно и то же. Значит, в рисунке восемь в подписи следует заменить нормальные клетки на «неделяющиеся клетки». В рисунке четыре...«четыре молекулы» АТФ заменить на «примерно четыре молекулы АТФ». В подписи к рисунку девятнадцать. Написано «поворот по вертикали», а надо «по горизонтали». Ну и на странице сорок один лишнее слово. Несмотря на вышеприведенные замечания диссертационная работа Ларионовой Татьяны Дмитриевны является законченным, квалифицированным исследованием, выполненном на высоком методологическом уровне с хорошим теоретическим обоснованием. Полученные результаты могут быть использованы как для изучения фундаментальных основ клеточной гетерогенности опухолей, так и для потенциальной разработки терапии, нацеленной на популяцию лечение глиобластом. Результаты работы представлены в 6 статьях в рецензируемых научных журналах и в двух тезисах конференций. Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации. Таким образом, можно заключить, что работа Ларионовой Т.Д. соответствует критериям, в том числе, пункту девятого.

установленного «Положением о порядке присуждения ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от двадцать четвертого девятого тринадцатого, номер восемьсот сорок два с изменениями Постановлений Правительства РФ от: двадцать первого четвертого шестнадцатого номер триста тридцать пять, второго восьмого шестнадцатого номер семьсот сорок восемь, двадцать девятого пятого семнадцатого года номер шестьсот пятьдесят, двадцатого третьего двадцать первого года номер четыреста двадцать шесть, одиннадцатое девятое двадцать первого номер тысяча пятьсот тридцать девять, двадцать шестое девятое двадцать второго года тысяча шестьсот девяносто. Это все такие уточнения, да...предъявляемым к диссертациям, представленным на соискание ученой степени кандидата наук. Уровень и качество исследований, представленных в диссертации и автореферате Ларионовой показывают, что автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности «Молекулярная биология». Спасибо за внимание.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Спасибо. Татьяна Дмитриевна, в отзыве Егора Евгеньевича содержались замечания. Пожалуйста, ответьте на них.

Соискатель (Ларионова Т.Д.): Большое спасибо Егору Евгеньевич, за ваши замечания. По поводу первого замечания на счет личного вклада автора и отсутствия благодарностей, да, я не указала, к сожалению, благодарностей в диссертации, моя оплошность, вот. Я прошу за это прощения. Тем не менее в свое оправдание могу сказать, что я лично поблагодарила людей, которые участвовали в реализации этой работы и также в конце нашего мероприятия в этот микрофон также их поблагодарю. Вот. Относительно личного вклада. Работа у нас выполнена большим коллективом авторов и. Да, конечно, не все здесь делала лично я. Лично мной сделано мокрая биология, т.е., например, я не выделяла опухоли от пациентов, также я не проводила РНК-секвенирование, однако образцы готовила к этому я и наоборот с образцами глиобластом также работала я. Вот, ну и по поводу мелких замечаний, как вы сказали. Большое спасибо, я буду впредь быть внимательней и уделять этим моментам особое внимание.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Егор Евгеньевич, вы удовлетворены ответами Татьяны Дмитриевны?

Д.б.н. Егоров Егор Евгеньевич, официальный оппонент: Полностью.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Спасибо. Спасибо. Тогда, Владимир Александрович, зачитайте, пожалуйста, отзыв второго оппонента, который, напоминаю, по уважительной причине отсутствует. Бойчук Сергей Васильевич.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: *(Излагает отзыв. Отзыв положительный. Отзыв прилагается)* Да, Бойчук Сергей Васильевич. Значит, отзыв тоже полностью положительный. Опять же, начинается с актуальности, о важности борьбы с онкологическими заболеваниями. Но подчеркивается: «В работе Ларионовой устанавливается взаимосвязь между микроокружением опухолевых клеток и внутриклеточными процессами, формирующими фенотипическое разнообразие опухоли. Таким образом, не вызывает сомнения актуальность данного исследования». Новизна, опять же, подчеркивается, что было сделано сразу несколько интереснейших наблюдений, характеризующихся несомненной научной новизной. Ну, я не буду оговаривать, потому что мы только что все это, так сказать, более-менее слышали, все это говорилось и подчеркивалось и... Достоверность. Прделан внушительный объем работы, причем на

очень высоком методическом уровне. Надежность и достоверность полученных результатов обеспечивается квалифицированным использованием современных молекулярно-биологических и культуральных методов. Во всех проводимых экспериментах поставлены адекватные контроли, использовано достаточное количество повторов. Выводы диссертации основаны на полученных результатах и логически вытекают из проведенных экспериментов. Печатные работы и автореферат в полной мере отражают содержание диссертации. Структура – традиционная схема. Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, где подробно описано все, что должно быть описано, Результаты и обсуждения довольно обширны, разделены на пять этапов. Опять же, вот прямо пять этапов, которые мы слушали в докладе. В Заключение автором кратко суммируются полученные результаты. Выводы, сделанные из проведенной работы, полностью отражают суть полученных результатов. Итак, замечания. В ходе ознакомления с диссертацией Ларионовой у меня возникли некоторые вопросы и замечания:

Первое. Известно, что закисление внеклеточного рН отрицательно влияет на пролиферацию клеток. Это, в свою очередь, может приводить к уменьшению в клетках количества рибосом. Поэтому данные масс-спектрометрии, изображенные на рисунке двадцать пять Б, могут свидетельствовать не о разнице в количествах белках рибосомы, а о разнице в количествах самих рибосом. В связи с этим хотелось бы получить больше информации по поводу нормирования данных, представленных на рисунке двадцать пять Б.

Второе. Все эксперименты в данной работе построены на оверэкспрессии изоформ RPL22L1 в клетках. Однако напрашивается вопрос: что будет с клетками, если провести нокдаун одной и второй изоформы? Будут ли клетки жизнеспособны? Проводились ли в рамках данной работы такие эксперименты?

Третье. В тексте встречается некорректное использование некоторых терминов. Например, на рисунке двадцать семь А представлены результаты электрофореза кДНК. Однако подпись к рисунку утверждает, что изображено «соотношение изоформ RPL22L1». В этом случае правильнее была бы подпись «соотношение мРНК изоформ RPL22L1», так как термин «изоформа» все же подразумевает белок.

Четвертое. На рисунке двадцать восемь Д стоило бы отметить пик, соответствующий уникальному пептиду изоформы RPL22L1b.

Пятое. В Списке использованной литературы под номером восемьдесят восемь находится лишний источник.

Шестое. Хотя работа в целом выполнена на очень высоком уровне, в тексте встречаются многочисленные опечатки и стилистические ошибки.

Но тем не менее, указанные вопросы и недостатки не снижают ценность диссертационной работы и благоприятного ее впечатления. И подчеркивается, отмечается в заключении, что эта работа является самостоятельным законченным исследованием и полностью соответствует всем критериям, и сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности один пять три по специальности «Молекулярная биология». Подписано официальным оппонентом – это зав. кафедрой об зав. кафедрой общей патологии ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» доктор

медицинских наук, профессор, член-корреспондент Академии наук Республики Татарстан
Бойчук Сергей Васильевич.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Спасибо, Владимир Александрович. Татьяна Дмитриевна, пожалуйста, ответьте на замечания Сергея Васильевича.

Соискатель (Ларионова Т.Д.): Большое спасибо Сергею Васильевичу за его вопросы касательно первого вопроса по поводу разницы в количествах именно рибосом в коровых и краевых клетках. Сергей Васильевич говорит вот про вот этот вот график. Мы конечно же проводили нормирование этих данных и мы нормировали наши данные на общее количество выделенных рибосомных белков. Вот, так что мы как бы отсекали возможность того, что разница в количестве рибосом. Вот, кроме того, если бы было так как говорит Сергей Васильевич, то мы бы видели, что на этом графике количество рибосомных белков из коровых клеток всегда стабильно меньше, чем рибосомных белков в краевых. Тем не менее из графика мы это не видим, т.е. какая-то часть, действительно, понижена, но есть и более высокие белки и более низкое содержание белков, т.е. соответственно, мы можем сказать, что все нормально. Далее по поводу нокдауна. Мы не проводили в данной работе нокдаун наших изоформ. Тем не менее, клетки с отсутствием а или б изоформ, они вполне жизнеспособны. Так про а-изоформу известно например, что её в клетках и в рибосомах может и не быть и клетки вполне нормально себя чувствуют.. Вот, кроме того у нас есть такая картинка, вот. Тут представлено форец, днк-форез и, как видно, ну, в центре у нас, значит контроль и всегда а-, по краям у нас оверэкспрессия одной и второй изоформы. Как видно в каких-то клетках преобладает а-изоформа, в каких-то б-изоформа и в общем то клетки нормально себя чувствуют, они у нас нормально растут, у нас таких клеток очень много, всё с ними хорошо. Кроме того по поводу отсутствия нокдауна, то, если посмотреть, то в клетках присутствует либо одна изоформа и отсутствует вторая в норме без оверэкспрессии, либо наоборот – присутствует вторая – отсутствует первая. Также есть некий промежуточный вариант, когда есть и та и та изоформа, т.е. на основании этих данных мы можем предположить, что есть какой-то механизм взаимной регуляции экспрессии этих изоформ. Да, т.е. экспрессируется а-изоформа эндогенная и практически исчезает б-изоформа. И наоборот: экспрессируется б-изоформа и практически исчезает а-изоформа. Кроме того при оверэкспрессии. Например, при оверэкспрессии а-изоформы однозначно исчезает б-изоформа и наоборот. Вот, т.е. мы предполагаем, что как-то они взаимно регулируют экспрессию друг друга и, поэтому, если мы сделаем нокдаун, то, возможно мы будем наблюдать эффект, что нокдаун одной изоформы приведет к увеличению количества другой изоформы. Соответственно, то, что мы будем видеть на клетках будет вызвано не только, это будет не только следствием нокдауна вот той изоформы, которой мы сделали нокдаун, а также и следствием повышения экспрессии второй изоформы, это будет вносить существенную путаницу в интерпретацию результатов. Вот поэтому в данной работе так как мы все таки сравнивали влияние изоформ одной второй на клетки мы посчитали, что для наших целей больше подходит именно оверэкспрессия. Поэтому нокдауна мы стремились в какой-то степени избежать. Относительно замечаний, касающихся текста работы, неправильно использованных терминов и ошибок. Да, за ошибки я уже каялась нужно мне делать более тщательную вычитку текста, а по поводу поправки по поводу неправильно использованного термина, да, большое спасибо я посмотрела, в диссертации совершаю, в

общем-то, регулярно. Так что спасибо Сергей Васильевичу, я обязательно учту его пожелания.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Спасибо. Так, уважаемые коллеги. Тогда предлагаю начать публичную дискуссию по работе, по основным результатам, выводам. Кто хотел бы выступить, пожалуйста. Я пока не вижу. Видимо, результаты и выводы убедили членов диссертационного совета и всех присутствующих. Не вижу желающих выступить. Но мы и так уже тут много, считай, обсудили, и задали много вопросов, услышали на них ответы. Так. Тогда слово предоставляется Татьяне Дмитриевне для заключительного слова. Пожалуйста.

Соискатель (Ларионова Т.Д.): Спасибо. Мне бы хотелось в своем заключительном слове сказать, выразить благодарность тем людям, которые принимали участие в реализации этой работы. В первую очередь мне бы хотелось сказать большое спасибо моим оппонентам – это Сергей Васильевич и Егор Евгеньевич – за то, что они приняли участие в сегодняшней защите. Также мне хотелось сказать большое спасибо моим консультантам-руководителям – это Павлюкову Марату Самвеловичу и Шахпаронову Михаилу Ивановичу, без которых эта работы не состоялась бы. Также хочу сказать спасибо руководителю нашего отдела Донцовой Ольге Анатольевне, и членам нашей лаборатории, которые меня поддерживали все это время и помогли в каких-то моментах. Ну и еще хотелось бы сказать большое спасибо сотрудникам, которые работают не в нашем институте. В первую очередь, это Штиль Александр Альбертович, который периодически подкидывает нам интересные молекулы для исследования. Также хотелось бы сказать большое спасибо двум девушкам. Которые помогли нам с биоинформатикой и протеомикой – это Ануфриева Ксения и Шендер Виктория. И еще хотелось бы сказать большое спасибо Андрееву Дмитрию Евгеньевичу за помощь в фракционировании полисом. Большое спасибо.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Спасибо. Так, уважаемые коллеги. Предлагается для тайного голосования следующий состав счетной комиссии: Бовин Николай Владимирович, Уткин Юрий Николаевич и Олейников Владимир Александрович. Есть ли у членов совета возражения, отводы, самоотводы? Прошу голосовать. Кто за состав этой комиссии? Против? Воздержался? Принято единогласно. Поэтому сейчас объявляется пятиминутный перерыв. Вот, Владимир Александрович подсказывает трехминутный перерыв, чтобы вы не успели далеко уйти из членов диссертационного совета. И после этого мы продолжим.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Так, уважаемые коллеги. Да, если нет у членов диссертационного совета замечаний, вопросов по проведенным процедурам, мы приступаем к тайному голосованию. Состав счетной комиссии был озвучен. Спасибо.

(Проходит тайное голосование)

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Уважаемые коллеги, пока работает счетная комиссия, просьба ознакомиться с проектом заключения по диссертации. *(Проходит обсуждение проекта заключения диссовета. Бовин Н.В. предлагает внести небольшие редакторские поправки в текст).*

(Далее оглашаются результаты работы счетной комиссии)

Уч. секретарь, д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович: Счетная комиссия завершила свою работу. Ну и соответственно. Татьяна Дмитриевна Ларионова. Значит. Присутствовало на заседании двадцать членов совета, роздано бюллетеней – двадцать, оказалось в урне – двадцать, за – двадцать, против и недействительных нет.

Зам. председателя, д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович: Уважаемые члены совета, предлагается утвердить результаты открытым голосованием. Кто за то, чтобы утвердить эти результаты? Против? Нет. Воздержались? Нет. Приняты единогласно (*результаты тайного голосования утверждены единогласно*). Мы уже обсудили проект заключения по диссертации. Предлагается утвердить заключение. (*Проходит голосование по проекту заключения диссертационного совета*) Против – нет. Воздержались – нет. Принято единогласно. (*Проект заключения принимается единогласно*) На этом мы заканчиваем работу нашего диссертационного совета. Поздравляем.

Зам. председателя
диссертационного совета
д.ф.-м.н.



Ефремов Роман Гербертович

Ученый секретарь
д.ф.-м.н.

Олейников Владимир Александрович