

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, по диссертации  
на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 15 февраля 2023 года №3

О присуждении **Ларионовой Татьяне Дмитриевне** ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Сравнительный анализ изоформ рибосомального белка RPL22L1 в регуляции фенотипа клеток глиобластомы» по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология принята к защите 07 декабря 2022 года (протокол заседания №30) 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, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10), действующим на основании Приказов Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021г.

Соискатель Ларионова Татьяна Дмитриевна, 23 ноября 1993 года рождения. В 2017 году соискатель окончила магистратуру Московского технологического университета (ранее – МИТХТ им. М.В. Ломоносова) по направлению «Биотехнология». С 2017 по 2021 год обучалась в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории мембранных биоэнергетических систем ИБХ РАН. Диссертация выполнена в лаборатории мембранных биоэнергетических систем ИБХ РАН

Научный руководитель – доктор химических наук, Шахпаронов Михаил Иванович, заведующий лабораторией мембранных биоэнергетических систем ИБХ РАН.

Научный консультант – доктор биологических наук, Павлюков Марат Самвелович, ведущий научный сотрудник лаборатории мембранных биоэнергетических систем ИБХ РАН.

Официальные оппоненты:

**Бойчук Сергей Васильевич**, д.м.н., профессор, член-корреспондент Академии наук Республики Татарстан, заведующий кафедрой общей патологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Казанский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации и **Егоров Егор Евгеньевич**, д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук дали **положительные** отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация** – Государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, в своем **положительном** отзыве, подписанном ведущим научным сотрудником лаборатории генетики опухолевых клеток, д.б.н. Шушановым Саином Сакеновичем и утвержденном директором, д.м.н., профессором, академиком РАН Стилиди Иваном Сократовичем, указала, что диссертация Ларионовой Т.Д. полностью соответствует всем требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 20 марта 2021 года №426, от 11 сентября 2021 г. №1539), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Соискатель имеет 6 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 6 работ общим объемом 9 печ.л. в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных Web of Science и Scopus). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме, в которые Ларионова Т.Д. внесла основной либо существенный вклад, включают:

- 1) Alternative RNA splicing modulates ribosomal composition and determines the spatial phenotype of glioblastoma cells / **Larionova T.D.**, Bastola S., Aksinina T.E., Anufrieva K.S., Wang J., Shender V.O., Andreev D.E., Kovalenko T.F., Arapidi G.P., Shnaider P.V., Kazakova A.N., Latyshev Y.A., Tatarskiy V.V., Shtil A.A., Moreau P., Giraud F., Li C., Wang Y., Rubtsova M.P., Dontsova O.A., Condro M., Ellingson B.M., Shakhparonov M.I., Kornblum H.I., Nakano I., Pavlyukov M.S. // *Nat Cell Biol*, 2022 V. 24, no. 10, P. 1541-1557.
- 2) Прогностическая значимость белков-регуляторов сплайсинга РНК для пациентов с глиобластомой / **Т. Д. Ларионова**, Т. Ф. Коваленко, М. И. Шахпаронов, М. С. Павлюков // *ДАН. Науки о жизни*, 2022, Т. 503, № 1, стр. 166-171.
- 3) Functions of long non-coding RNA ROR in patient-derived glioblastoma cells. / Kovalenko T.F., Yadav B., Anufrieva K.S., Rubtsov Y.P., Zatsepin T.S., Shcherbinina E.Y., Solyus E.M., Staroverov D.B., **Larionova T.D.**, Latyshev Y.A., Shakhparonov M.I., Pandey A.K., Pavlyukov M.S. // *Biochimie*, 2022, V. 200, P. 131-139.
- 4) Т.Ф. Коваленко\*, **Т.Д. Ларионова\***, Н.В. Антипова, М.И. Шахпаронов, М.С. Павлюков. Некодирующие РНК в патогенезе глиальных опухолей. *Acta Naturae*, 2021, Т. 13, № 3, с. 28 – 41. \* - **равный вклад**
- 5) Establishment of Murine Hybridoma Cells Producing Antibodies against Spike Protein of SARS-CoV-2. / N. V. Antipova, **T. D. Larionova**, A. E. Siniavin, M. A. Nikiforova, V. A. Gushchin, I. I. Babichenko, A. V. Volkov, M. I. Shakhparonov, M. S. Pavlyukov // *Int J Mol Sci*, 2020, Vol. 21, no. 23, P. 9167.

6) Properties of a cryptic lysyl oxidase from haloarchaeon *Haloterrigena turkmenica* / N. B., Pestov, D. V. Kalinovsky, **T. D. Larionova**, A. Z. Zakirova, N. N. Modyanov, I. A. Okkelman, T. V. Korneenko // *PeerJ*, 2019, V. 7, P. e6691.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента, д.б.н., профессора Егорова Егора Евгеньевича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания и рекомендации:

1) Из текста диссертации неясен личный вклад автора. Отсутствуют благодарности и указания на помощь в работе. В оглавлении диссертации приведено описание 55!!! использованных методов и совершенно ясно, что один человек физически не способен ими владеть. Только из текста автореферата стало ясно, какими методами владеет собственно диссертант.

2) Слишком большой список сокращений, куда включены всем известные вещи: АТФ, ДНК, РНК, кДа, мл, мин, мкм и т.д. При том, что сама работа суперсложна, такой список просто затрудняет его использование. Неточность:  $\psi$  – псевдоуридилирование; должно быть псевдоурдин. Написано GBM – glioblastoma multiforme, в тексте используется термин глиобластома. Возможно, стоило в списке сокращений пояснить, что это одно и то же.

3) Рис.8. В подписи следует заменить нормальные клетки на неделящиеся клетки. В рисунке: 4 молекулы АТФ заменить на примерно 4 молекулы АТФ. 4 подпись к рисунку 19 Написано поворот по вертикали, надо по горизонтали. 5 стр.41. В последней строке лишнее слово «также».

2. Отзыв официального оппонента, д.м.н., профессора, Бойчука Сергея Васильевича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания и рекомендации:

1) 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 рис. 25Б, 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 рис. 25Б.

2) 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?

3) В тексте встречается некорректное использование некоторых терминов. Например, на рис. 27А 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.

4) На рис. 28Д стоило бы отметить пик, соответствующий уникальному пептиду изоформы RPL22L1b.

5) В Списке использованной литературы под номером 88 находится лишний источник.

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

**3. Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный. Содержит следующие вопросы и замечания:**

1) 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 потенциально может взаимодействовать с множеством молекул РНК, необходимо особое внимание уделить подтверждению специфичности такого взаимодействия. В частности, можно провести «обратный» эксперимент, когда из клеток методом преципитации будут выделены белки, взаимодействующие с MALAT1, и проанализированы на наличие среди них RPL22L1b.

2) Хотелось бы рекомендовать автору формулировать выводы более аккуратно. В частности, вывод «Экспрессия RPL22L1b влияет на сплайсинг в клетках GBM за счет деградации длинной некодирующей РНК MALAT1» (с учетом указанного в п.1) следовало бы формулировать осторожнее.

3) В тексте имеются грамматические ошибки и опечатки.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике работы (изучение молекулярных основ канцерогенеза, ответа клетки на стресс, поиск мишеней противоопухолевой терапии), которые подтверждены сериями их публикаций в российских и международных журналах. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований была впервые описана ранее неизвестная изоформа рибосомального белка RPL22L1b, которая обладает внерибосомными функциями и принимает участие в формировании у клеток глиобластомы свойств стволовых. Впервые продемонстрировано, что изменение сплайсинга пре-мРНК RPL22L регулируется белком SRSF4. Кроме того, на

основании полученных в работе данных предложен новый механизм возникновения внутриопухолевой гетерогенности глиобластом.

**Теоретическая значимость** исследования обоснована тем, что результаты проведенной работы существенно расширяют представления о роли сплайсинга пре-мРНК в регуляции протеома клеток.

**Значение** полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что они позволяют существенно расширить спектр мишеней для разработки противоопухолевой терапии. Кроме того, соискателем было показано, что фармакологическое нарушение сплайсинга пре-мРНК RPL22L1 снижает агрессивность опухоли. Одно из веществ, обладающих таким действием, рассмотрено в работе. Аналоги или производные данного вещества представляются многообещающими противоопухолевыми агентами. Полученные данные также свидетельствуют о перспективности воздействия на сплайсинг или трансляцию в качестве терапии. Кроме того, присутствие белка RPL22L1b может являться прогностическим маркером менее благоприятного прогноза при глиобластоме.

Личный вклад соискателя состоит в участии в планировании и проведении экспериментов, анализе и обработке полученных данных, представлении результатов работы на российских конференциях, подготовке публикаций по теме исследования. Все исследования по теме диссертации, за исключением РНК-секвенирования (проводилось сотрудниками University of California Los Angeles, Los Angeles, CA, USA), анализа протеома (проводилось сотрудниками ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия), биоинформатического анализа (проводилось сотрудниками ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА, Москва, Россия), фракционирования полисом (проводилось сотрудниками МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия) и опытов *in vivo* (проводились сотрудниками University of California Los Angeles, Los Angeles, CA, USA и The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, China), проведены лично соискателем.

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет 24.1.037.01 заключает, что диссертационная работа Ларионовой Татьяны Дмитриевны является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена научная задача по исследованию роли альтернативного сплайсинга рибосомальных белков в формировании внутриопухолевой гетерогенности глиобластом, что вносит существенный вклад в развитие исследований в области молекулярной биологии и медицины. Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты, а по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3 – Молекулярная биология. Таким образом, диссертационная работа Ларионовой Татьяны Дмитриевны «Сравнительный анализ изоформ рибосомального белка RPL22L1 в регуляции фенотипа клеток глиобластомы»,

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).

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания:

- 1) Про сам белок RPL22L1 было сказано очень мало. Что это за белок? Какова его структура? Известна ли доменная структура этого белка и как она связана с функциями этого белка?
- 2) Насколько распространённо явление гетерогенности рибосом?
- 3) Насколько надежно разделение на «коровые» и «краевые» клетки глиобластомы, которая сама по себе очень неоднородна.
- 4) Какой механизм действия вещества Fg1059?
- 5) RPL22L1a не является компонентом рибосомы, каким образом она влияет на трансляцию мРНК?

Соискатель Ларионова Татьяна Дмитриевна ответила на задаваемые ему в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

- 1) RPL22L1 является паралогом белка RPL22. Гомология RPL22L1a и RPL22 составляет 70%, RPL22L1b и RPL22 – 19%. О структуре RPL22L известно мало, практически ничего, и найти информацию о ней в базах данных не получилось. Все структуры рибосом, представленные в базах данных, содержат белок RPL22. Можно предположить, что RPL22L1a связывается с рибосомой в том же месте, где и RPL22.
- 2) Гетерогенность рибосом достаточно распространена и обнаружена у многих организмов, начиная от дрожжей и заканчивая человеком.
- 3) В работе мы старались как можно более четко выделять коровые и краевые клетки. Коровые клетки выделяли из некротической зоны, а краевые – из областей опухоли, граничащих с нормальным мозгом. Кроме того, мы подтверждали принадлежность клеток с помощью основных маркеров на коровые и краевые клетки.
- 4) Fg1059 является ингибитором киназ семейства CLK, он связывается с АТФ-связывающим карманом этих киназ и блокирует их действие. В результате киназы не могут фосфорилировать факторы сплайсинга семейства SRSF, что и приводит к нарушениям сплайсинга.
- 5) В структуре RPL22L1a есть РНК-связывающие домены.

На заседании 15 февраля 2023 года диссертационный совет постановил: за решение научной задачи, посвященной изучению механизмов возникновения внутриопхолевой гетерогенности, имеющей важное значение для развития молекулярной биологии, присудить Ларионовой Татьяне Дмитриевне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек, из них 6 докторов наук (по научной специальности 1.5.3. – Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Зам председателя  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Ефремов Р.Г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.



15.02.2023 г.