

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.230.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ПО ДИССЕРТАЦИИ АЛЕКСАНДРЫ АЛЕКСАНДРОВНЫ ДАКС
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 31 марта 2017 года, № 220/399

О присуждении АЛЕКСАНДРЕ АЛЕКСАНДРОВНЕ ДАКС (Россия)
учёной степени кандидата биологических наук

Диссертация **«ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
УБИКВИТИНЛИГАЗЫ PIRN2 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ
ЧЕЛОВЕКА»**

По специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»

Принята к защите 23.12.16 г., протокол №216/395 Диссертационным советом

Д 002.230.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук, адрес: 194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4, утверждён приказом Минобрнауки РФ №105/нк от 11.04.2012 г.

Соискатель Александра Александровна Дакс, 1985 года рождения, в 2011 г. окончила биолого-почвенный факультет Санкт-Петербургского государственного Университета по специальности «биология» по профилю специализации «биология клетки». Работа выполнена в порядке прохождения очной аспирантуры с 07.06.2013 по 22.08.2016 на Факультете химической и биотехнологии Санкт-Петербургского государственного технологического института (Технического университета) под руководством д.б.н. Николая Анатольевича Барлева.

Работает в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии РАН с 2014 года в Лаборатории регуляции экспрессии генов и является младшим научным сотрудником.

Диссертация выполнена в Лаборатории регуляции экспрессии генов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук.

Научный руководитель:

Барлев Николай Анатольевич, доктор биологических наук (специальность 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология»), заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

1. **Имянитов Евгений Наумович**, доктор медицинских наук (по специальностям 14.00.14 – онкология и 03.01.04 -биохимия), профессор, руководитель лаборатории молекулярной онкологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург
2. **Зарицкий Андрей Юрьевич**, доктор медицинских наук (по специальности 14.01.21 – гематология и переливание крови), Директор Института гематологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург
дали положительные отзывы на диссертацию

Ведущая организация:

Ведущая организация - Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва) в своём положительном заключении (заключение составили д.б.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России - директор НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Михаил Александрович Красильников и д.м.н., заведующая отделом химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Марианна Геннадиевна Якубовская.) **указала, что диссертационная работа представляет собой законченное**

исследование, является научной квалификационной работой и соответствует всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к кандидатским диссертациям, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология, и **-дала положительный отзыв на диссертацию.**

Соискатель имеет 15 опубликованных работ по теме диссертации, из них

4 статьи (2 п.л.) в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, и 11 тезисов докладов.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. **Дакс, А. А.,** Д. Мелино, Н. А. Барлев. "Роль различных Е3-убиквитинлигаз в регуляции активности онкосупрессора p53" Цитология. 55(10). С. 673–687. (2013).

Статья посвящена известным на сегодняшний день ферментам, специфически убиквитинирующим онкосупрессорный белок p53 и их роли в канцерогенезе.

2. Shuvalov, O., Petukhov, A., **Daks, A.,** Fedorova, O., Ermakov, A., Melino, G., Barlev, N. Current genome editing tools in gene therapy: new approaches to treat cancer. Current gene therapy. 15. P. 511-529. (2015).

Статья посвящена основным современным методам редактирования генома человека в контексте их применения в противоопухолевой терапии. Разрабатываемые методы генной терапии рассмотрены с точки зрения их потенциального использования в таргетной генной противоопухолевой терапии.

3. Шувалов, О. Ю., Федорова, О. А., Петухов, А. В., **Дакс, А. А.,** Васильева, Е. А., Григорьева, Т. А., Барлев, Н. А. Негативные регуляторы онкосупрессора p53 в контексте направленной противоопухолевой терапии. Цитология, 57(12), С. 847-854. (2015).

В статье рассматриваются потенциальные возможности использования направленной модуляции функций p53-специфичных убиквитинлигаз для терапии опухолевых заболеваний человека.

4. **Дакс, А. А.**, Петухов, А. В., Шувалов, О. Ю., Васильева, Е. А., Мелино, Д., Барлев, Н. А., Федорова, О. А. Онкосупрессор p63 регулирует экспрессию убиквитинлигазы Pirh2. Цитология, 57(12). С. 876-879. (2015). Статья посвящена описанию нового механизма регуляции экспрессии белка Pirh2 за счет полноразмерной изоформы транскрипционного фактора p63.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Профессора кафедры Клеточной биологии и анатомии Университета Флорида (США), к.б.н. по специальности 03.00.25 - «Гистология, цитология, клеточная биология» **Александра Михайловича Ишова;**

2. Профессора Национального института медицинских исследований Университета Бургундии (Франция), к.м.н. по специальностям 14.03.03 – «Патологическая физиология» и 30.05.01 - «Медицинская биохимия» **Олега Николаевича Демидова;**

3. Заведующего отделом поисковых исследований Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета, члена-корреспондента Академии наук Республики Татарстан, заместителя руководителя стратегической академической единицы Трансляционная 7П медицина, г.н.с., доктора биологических наук по специальности 03.01.04 – «Биохимия», Ph.D., профессора кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета **Альберта Анатольевича Ризванова;**

4. Заведующего лабораторией молекулярных основ патогенеза, заместителя директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Казанского института биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук, доктора биологических наук, профессора **Владислава Моисеевича Чернова;**

5. Заведующего Лабораторией нанобиотехнологий Московского физико-технического института (государственного университета), кандидата физико-математических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология» **Максима Петровича Никитина.**

6. Заведующего Лабораторией геномной инженерии Московского физико-технического института (государственного университета), кандидата биологических наук по специальностям 03.01.03 – «Молекулярная биология» и 03.00.26 – «Молекулярная генетика» **Павла Юрьевича Волчкова.**

Все отзывы положительные, без критических замечаний.

В дискуссии принимали участие:

1. Д.б.н. **С.Ю. Хайтлина**, член Совета
2. Д.б.н., проф. **Е.С. Корнилова**, член Совета
3. Д.б.н., **Б.А. Маргулис**, г.н.с., зав. ОКК ИНЦ РАН
4. Д.б.н., проф. **М.И. Мосевичкий**, член Совета
5. Д.б.н., проф. **Е.Р. Гагинская**, член Совета

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией выбранных специалистов в области молекулярной биологии, в частности исследования молекулярных механизмов онкогенеза, а так же в использовании протеомного подхода.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана новая научная концепция о регуляции экспрессии и функционировании убиквитинлигазы Pirh2 в раковых клетках человека, расширяющая современные знания о механизмах опухолевой трансформации;

предложена научная гипотеза, получившая экспериментальное подтверждение, о регуляции экспрессии гена *RCHY1* транскрипционным фактором p63;

доказано, что транскрипционный фактор p63, а именно его полноразмерная изоформа TAp63, активирует экспрессию гена *RCHY1*, кодирующего белок Pirh2, в клетках с отсутствием p53;

введены представления о более 200 не известных ранее интерактантах E3-убиквитинлигазы Pirh2, участвующих в транскрипции, организации генома, процессинге РНК, метаболизме, репарации и играющих важную роль в онкогенезе, что свидетельствует о вероятном участии Pirh2 в данных процессах;

доказано, что убиквитинлигаза Pirh2 функционально взаимодействует с гистоном H2A.Z и осуществляет его моноубиквитинирование;

доказано, что Pirh2 функционально взаимодействует с РНК-связывающим белком Elavl1/HuR, полиубиквитинирует его и направляет на протеасомную деградацию;

доказано, что белок Pirh2 усиливает онкогенный потенциал клеток линии немелкоклеточной карциномы легкого человека H1299, повышая их миграционную способность, пролиферацию и устойчивость к химиотерапевтическому препарату доксорубицину.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения, расширяющие существующие представления о регуляции экспрессии, белковых взаимодействиях и роли в канцерогенезе E3-убиквитинлигазы Pirh2;

применительно к проблематике диссертации результативно использован широкий спектр современных методов молекулярной и клеточной биологии: GST-пулдаун с последующей LC-MS/MS масс-спектрометрией, ОТ-ПЦР в РВ, вестерн-блот анализ, МТТ-тест, анализ пролиферации и миграции клеток в реальном времени, лентивирусная трансдукция и др.

изучен новый р63-зависимый механизм регуляции экспрессии гена *RCHY1*, кодирующего белок Pirh2;

изложены новые экспериментальные данные о физическом взаимодействии Pir2 с более чем 200 различными белками, принимающими участие в транскрипции, организации генома, процессинге РНК, метаболизме, репарации и играющих важную роль в онкогенезе;

раскрыта функциональная значимость взаимодействия убиквитинлигазы Pirh2 с белками H2A.Z и Elavl1/HuR;

охарактеризована роль белка Pirh2 в формировании туморогенного потенциала клеток линии немелкоклеточной карциномы легкого человека H1299.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

определен механизм регуляции убиквитинлигазы Pirh2 за счет онкосупрессорного транскрипционного фактора р63;

выявлена туморогенная роль белка Pirh2 в клетках H1299, что позволяет рассматривать его как потенциальную мишень для разработки таргетной терапии опухолей легкого с негативным статусом р53;

на основании полученных данных об интерактоме Pirh2 и о его функциональном взаимодействии с гистоном H2AZ и Elavl/HuR **определены** новые направления исследований Pirh2-зависимой регуляции таких процессов как опухолевая трансформация клеток, продвижение клетки по клеточному циклу и активация апоптоза.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

- **результаты**, представленные в диссертации, получены на исправном и сертифицированном оборудовании, выбор использованных методов и подходов обоснован, показана воспроизводимость результатов исследования,
- **теория** построена на известных, проверенных литературных данных и полностью соответствует опубликованным экспериментальным данным по теме диссертации,

- **идея основывается** на глубоком анализе и обобщении как литературных, так и экспериментальных данных, полученных автором,
- **использовано** сравнение результатов, полученных автором, с ранее опубликованными по теме диссертации литературными данными,
- **установлено**, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обоснованным,
- **использованы** современные экспериментальные подходы и адекватные методики статистической обработки данных, а именно, протеомный подход анализа интерактома (LC-MS/MS), оценка экспрессии генов на уровне белка (вестернблот) и РНК (ОТ-ПРЦ в РВ), анализ пролиферации и миграции клеток в режиме реального времени и др.

Личный вклад соискателя состоит в:

активном участии в определении направлений исследования и постановке конкретных задач, а также выборе методов и подходов для их решения, анализе результатов и формулировании выводов. Все основные эксперименты были выполнены автором лично. Автор принимал непосредственное участие в апробации полученных результатов и подготовке публикаций по теме диссертации. Диссертационная работа выполнена при финансовой поддержке грантов РНФ (проекты 14-50-00068 и 14-15-00816) и гранта РФФИ 16-34- 00869 мол_а.

Диссертация, посвященная функциональной характеристике убиквитинлигазы Pih2 в раковых клетках человека, является законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием в области молекулярной биологии, которое содержит решение научной задачи, имеющей большое значение для понимания процессов, лежащих в основе опухолевой трансформации клеток, апоптоза, пролиферации и устойчивости клеток к генотоксическим агентам. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных А.А.Дакс работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. Диссертационная работа полностью отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п.9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года) по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

На заседании 31 марта 2017 г. диссертационный совет принял решение присудить **Александре Александровне ДАКС** учёную степень кандидата биологических наук по специальности «Молекулярная биология» (03.01.03)

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 18 человек, из них 7 по специальности рассматриваемой диссертации, участвующих в заседании, из 24 человек, входящих в состав Совета, проголосовали:

«ЗА» 18, «ПРОТИВ» НЕТ, недействительных бюллетеней НЕТ.

Председатель заседания

Зам. председателя

Диссертационного совета Д 002.230.01

на базе ИНЦ РАН,

доктор биологических наук, профессор



С.Н. Борхсениус

Учёный секретарь

Диссертационного совета Д 002.230.01

На базе ИНЦ РАН,

Кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

«3» апреля 2017