

**Заключение диссертационного совета 24.1.172.01, созданного на базе
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени
В.Н. Ореховича», по диссертации на соискание ученой степени
кандидата наук**

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 05 декабря 2024 г. № 12

О присуждении Ромашину Даниилу Дмитриевичу, гражданину РФ, учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Функции мутантного р53 в кератиноцитах HaCaT» по специальности 1.5.4. – «биохимия» принята к защите 26 сентября 2024, протокол № 7, диссертационным советом 24.1.172.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения (ФГБНУ) «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», 119121, Россия, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, созданного Приказом Минобрнауки России № 105/нк от 11.04.2012 г. с внесением изменений Приказом Минобрнауки России № № 561/нк от 03 июня 2021 г. и Приказом Минобрнауки России № 1959/нк от 12 октября 2023 г.

Соискатель Ромашин Даниил Дмитриевич, 1995 года рождения.

В 2018 году соискатель окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования (ФГБОУ ВО) «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Биологический факультет. В 2022 году окончил очную аспирантуру по направлению подготовки 06.06.01 – Биологические науки при ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Работает младшим научным сотрудником в лаборатории прецизионных биосистем ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Диссертация выполнена в лаборатории прецизионных биосистем ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Научный руководитель – кандидат химических наук Русанов Александр Леонидович, старший научный сотрудник лаборатории прецизионных биосистем ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича».

Официальные оппоненты:

Воробьев Иван Иванович, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина), главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биоинженерии клеток млекопитающих;

Татарский Виктор Вячеславович, кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки (ФГБУН) Институт биологии гена Российской академии наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной онкобиологии;

ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки (ФГБУН) Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, гор. Москва, в своём положительном заключении, подписанном кандидатом биологических наук Сошниковой Наталией Валерьевной, старшим научным сотрудником лаборатории факторов транскрипции, указала, что в полном и исчерпывающем обзоре литературы хорошо было бы дать больше иллюстраций и таблиц, систематизирующих информацию о p53; отметила странный выбор контроля для изучения функций p53 – полный нокаут TP53, отсутствие проведения валидации методом количественной ПЦР результатов полногеномных сиквенсов РНК, и наличие некоторых опечаток.

Соискатель имеет 14 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 8 работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях - 6.

1. Romashin, D., Rusanov, A., Tolstova, T., Varshaver, A., Netrusov, A., Kozhin, P., Luzgina, N. Loss of mutant p53 in HaCaT keratinocytes promotes cadmium-induced keratin 17 expression and cell death //Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2024. – Т. 709. – С. 149834 (BAK – K1, WoS – Q2, IF – 3,1).

В работе впервые охарактеризованы функции мутантного p53R282Q/H179Y в отношении ингибирования апоптоза. Соискатель непосредственно участвовал в дизайне и проведении всех экспериментов, обработке первичных данных и анализе результатов, подготовке публикации.

2. Romashin, D., Rusanov, A., Arzumanyan, V., Varshaver, A., Poverennaya, E., Vakhrushev, I., Netrusov A.I., Luzgina, N. //Current Issues in Molecular Biology. – 2024. – Т. 46. – №. 2. – С. 1451-1466 (BAK – K1, WoS – Q2, IF – 3,1).

В статье впервые приведена характеристика онкосупрессорных функций мутантного p53R282Q/H179Y в кератиноцитах HaCaT, а также результаты транскриптомного профилирования клеток HaCaT дикого типа и с нокаутом TP53. Соискатель принимал участие в получении экспериментальных данных, их обработке и анализе, подготовке публикации.

3. Rusanov, A. L., Romashin, D. D., Kozhin, P. M., Karagyaour, M. N., Loginov, D. S., Tikhonova, O. V., Zgoda V.G., Luzgina, N. G. Impact of p53 knockout on protein data set of HaCaT cells in confluent and subconfluent conditions //Data. – 2022. – Т. 7. – №. 3. – С. 27 (BAK – K1, WoS – Q2, IF – 2,6)

В статье приведены методика CRISPR-интерференции гена TP53 и результаты протеомного исследования клеток HaCaT дикого типа и с нокаутом TP53. Соискатель принимал непосредственное участие в получении первичных данных, их обработке и анализе, подготовке публикации.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы от:

официального оппонента Воробьева Ивана Ивановича, доктора биологических наук, доцента Федерального государственного учреждения

«Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина), главного научного сотрудника, заведующего лабораторией биоинженерии клеток млекопитающих, в котором имеется ряд вопросов и замечаний. В частности, есть вопросы относительно специфичности найденных изменений по RNASeq в паттернах экспрессии генов для HaCaT и других кератиноцитов; относительно проведения RNASeq анализа и анализа протеома на разных стадиях роста клеток; отмечены некоторые замечания и вопросы по рисункам 7, 8, 20 и 23. Однако все замечания, вопросы и комментарии не влияют на общую высокую оценку работы и не умаляют её значимость.

официального оппонента Татарского Виктора Вячеславовича, кандидата биологических наук ФГБУН Институт биологии гена Российской академии наук, старшего научного сотрудника, заведующего лабораторией молекулярной онкобиологии, в котором высказаны вопросы, некоторые замечания и рекомендации. Так, спрашивается, насколько было велико пересечение генов, экспрессия которых достоверно менялась по данным транскрипционного анализа, и белков, идентифицированных в протеомном анализе; в будущих исследованиях целесообразно посмотреть p53 зависимые процессы при повреждениях ДНК и других случаях активации p53; следует с осторожностью говорить о том, что мутантный p53 обладает определенными свойствами, так как такой белок не сравнивали с белком дикого типа. Однако эти замечания и вопросы носят дискуссионный характер и не влияют на высокую оценку данной работы.

В положительном отзыве на автореферат кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника лаборатории клеточной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения (ФГБУ) «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического

агентства» Богомяковой Маргариты Евгеньевны, в качестве недостатков отмечено наличие небольшого количества опечаток и неудачных словосочетаний, которые не снижают положительную оценку работы и не умаляют значимость её результатов.

В положительном отзыве на автореферат, кандидата биологических наук, старшего научного сотрудника НИИ трансляционной медицины Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования (ФГАОУ ВО) «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Коростина Дмитрия Олеговича, отмечается, что сравнение мутантной формы p53 с белком дикого типа придало бы большую весомость данной работе. Однако этот комментарий носит дискуссионный характер и не умаляет значимость проведенного исследования.

В положительном отзыве на автореферат кандидата биологических наук, заведующего лабораторией функциональной геномики ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук Брускина Сергея Александровича, в качестве недостатков отмечено отсутствие в автореферате раздела «Материалы и методы», что не всегда компенсировано в описании самой работы; наличие некоторых опечаток и незначительное дублирование изложения в разделе «Заключение». Однако отмеченные замечания не являются существенными и не влияют на общее положительное впечатление от работы.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обоснован тем, что доктор биологических наук Воробьев Иван Иванович является ведущим специалистом в области исследований фундаментальных механизмов, контролирующих биосинтез и секрецию гетерологичных белков и жизнедеятельность клеток млекопитающих, а также организации клеточного генома и регуляции (в т.ч. методами генетического редактирования)

экспрессии генов, а кандидат биологических наук Татарский Виктор Вячеславович является авторитетным специалистом в области исследования механизма гибели опухолевых клеток и молекулярной биологии опухолей;

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук - один из ведущих научных центров, занимающийся фундаментальными и прикладными разработками в области молекулярных и генетических механизмов регуляции клеточных процессов, разработкой методов генетического редактирования, прежде всего методом CRISPR/Cas, и анализом результатов внесенных изменений на клетках и лабораторных животных.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

- впервые выполнен полный нокаут *TP53* в клетках HaCaT;
- впервые проведено молекулярное профилирование клеток HaCaT, дефицитных по p53;
- впервые показано, что полная инактивация p53 приводит к усилению миграционной активности клеток HaCaT;
- впервые дана комплексная функциональная характеристика мутантной формы p53 в кератиноцитах линии HaCaT;
- впервые установлено, что полученный мутант p53 ассоциирован с высокой пролиферативной активностью, ингибирует апоптоз и сохраняет онкосупрессорную активность в процессах, связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом, а также участвует в регуляции эпидермальной дифференцировки.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что с использованием методов транскриптомного и протеомного анализа, а также функциональных тестов, получены новые сведения о функциональных особенностях мутантного p53^{R282Q/H179Y}, которые могут иметь значение для понимания роли отдельных мутаций TP53 в процессе канцерогенеза. Полученные сведения также могут быть полезны при интерпретации данных,

полученных на клетках HaCaT и их экстраполяции на нормальные кератиноциты человека и эпидермис *in vivo*.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что новые сведения о функциональных особенностях p53^{R282Q/H179Y} могут иметь значимость в контексте диагностики и терапии онкологических заболеваний кожи человека, в связи с тем, что мутации R282Q/H179Y в TP53 часто встречаются при раке кожи.

Оценка достоверности результатов исследования подтверждается тем, что результаты работы верифицированы согласно современным научным представлениям. В каждом эксперименте, где это было применимо, проводился подходящий статистический анализ. Все препараты и расходные материалы, использовавшиеся в работе, были сертифицированы. Клетки приобретены в международной коллекции клеточных культур и культивированы согласно рекомендациям. Данные полнотранскриптомного профилирования выполнены в пакете DESeq2 и визуализированы современным приложением EnhancedVolcano. Первичные данные протеомного анализа опубликованы в базе данных ProteomeXchange Consortium под идентификационным номером PXD030700.

Личный вклад соискателя состоит в культивировании клеточной линии HaCaT; сборке редактирующей генетической конструкции, её молекулярном клонировании и трансфекции клеток; анализе скорости пролиферации, миграции и апоптоза клеток; определении иммунофенотипа клеток и их транскриптомного и протеомного профиля, проведении статистических анализов полученных данных и подготовке публикаций.

В ходе защиты диссертации не было высказано критических замечаний.

На заседании 05 декабря 2024 г. диссертационный совет принял решение присудить Ромашину Даниилу Дмитриевичу учёную степень кандидата биологических наук выполненную работу по получению комплексной характеристики мутантной формы белка p53 в кератиноцитах

НаСаТ (модели эпидермиса человека), сведения о которой могут иметь важное значение для повышения эффективности диагностики и терапии различных заболеваний кожи человека.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 19 человек, из них 11 докторов наук по специальности 1.5.4. – «биохимия», участвовавших в заседании, из 23 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 19, против - 0, недействительных бюллетеней – 0.

Зам. председателя Диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор



Медведев А.Е.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат химических наук



Карпова Е.А.

05 декабря 2024 года