

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 003.011.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО
ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

Аттестационное дело № _____
Дата защиты 19 февраля 2020 г. протокол № 3

О присуждении Маланхановой Туяне Баировне
учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Создание и характеристика клеточной модели болезни Хантингтона» по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, принята к защите 23.10.2019 г, протокол №18, Диссертационным советом Д 003.011.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», (630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10). Диссертационный совет Д 003.011.01 утверждён ВАК 15.01.2010, приказ ВАК № 1-7 и переутверждён Министерством образования и науки РФ 11.04.2012 года, приказ № 105/нк.

Соискатель: Маланханова Туяна Баировна, 1992 года рождения. В 2015 году окончила Новосибирский государственный университет, Новосибирск.

С 01.09.2015 г. по 31.08.2019 время Маланханова Т.Б. обучалась в очной аспирантуре Новосибирского государственного университета, г. Новосибирск. В период подготовки диссертации работала младшим научным сотрудником сектора постгеномной нейробиологии ИЦиГ СО РАН. В настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН.

Диссертация выполнена в лаборатории эпигенетики развития Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель: **Закиян Сурен Минович** – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории эпигенетики развития ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Официальные оппоненты:

1. **Салмина Алла Борисовна** - доктор медицинских наук, профессор, проректор по инновационному развитию и международной деятельности Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого, Красноярск.

2. **Кулемзин Сергей Викторович** - кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», г. Москва. В своём положительном заключении, подписанном руководителем лаборатории клеточной биологии ФГБУН «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» д.б.н., профессором РАН, член-корреспондентом РАН Лагарьковой М.А. и утверждённом генеральным директором ФГБУН «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» д.б.н., академиком РАН Говоруном В.М., указало, что «Диссертационная работа Маланхановой Туяны Баировны

«Создание и характеристика клеточной модели болезни Хантингтона», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология», по своему содержанию, уровню выполнения научных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов полностью соответствует п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842 (редакция №335 от 21.04.2016 г.), а её автор, Маланханова Т.Б., безусловно заслуживает присуждения искомой степени. Отзыв на диссертационную работу и автореферат Маланхановой Туяны Баировны был рассмотрен и обсуждён на объединённом семинаре лабораторий клеточной биологии и генной инженерии ФГБУН ФНКЦ ФХМ ФМБА России. (протокол заседания №1-2020 от 20 января 2020 г.)».

Соискатель имеет всего 18 публикаций, из них 15 - по теме диссертации, общим объёмом 118 страниц, в том числе 5 статей, опубликованных в научных рецензируемых изданиях, (Wos, Scopus) и 5 тезисов в материалах всероссийских и международных конференций.

Наиболее значительные статьи по теме диссертации:

1. Grigor'eva EV, Malankhanova TB, Surumbayeva A, Minina JM, Morozov VV, Abramychева NY, Illarioshkin SN, Malakhova AA, Zakian SM. Generation of induced pluripotent stem cell line, ICGi007-A, by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with Huntington's disease // Stem Cell Res. - 2019. - Т. 34. - С. 101382. (Wos, Scopus)
2. Morozova KN, Suldina LA, Malankhanova TB, Grigor'eva EV, Zakian SM, Kiseleva E, Malakhova AA. Introducing an expanded CAG tract into the huntingtin gene causes a wide spectrum of ultrastructural defects in cultured human cells // PLoS One. - 2018. - Т. 13(10). - С. e0204735. (Wos, Scopus)
3. Шарипова Д.В., Маланханова Т.Б., Малахова А.А. Моделирование болезни Хантингтона на клетках линии НЕК293 // Вавиловский журнал

генетики и селекции. - 2017. - Т. 21(7). С. 856-861. (Wos, Scopus)

4. Malankhanova T.B., Malakhova A.A., Medvedev S.P., Zakian S.M. Modern Genome Editing Technologies in Huntington's Disease Research // J Huntingtons Dis. - 2017. - Т. 6(1). - С. 19-31. (Wos, Scopus)

На диссертацию и автореферат поступило 17 отзывов, все положительные. Отзывы прислали:

1. Агладзе К.И. – к.ф.-м.н., проф., главный научный сотрудник лаборатории биофизики возбудимых систем МФТИ (г. Москва).
2. Александрова М.А. – д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории проблем регенерации ИБР РАН (г. Москва).
3. Асланян М.М. – д.б.н., проф. кафедры генетики МГУ (г. Москва).
4. Берсимбаев Р.И. – д.б.н., академик НАН РК, проф., зав. кафедрой общей биологии и геномики, директор Института клеточной биологии и биотехнологии ЕНУ им. Гумилева (г. Нур-Султан).
5. Гершович П.М. – директор департамента перспективных исследований ЗАО «БИОКАД» (г. Санкт-Петербург).
6. Дыбан П.А. – д.м.н., доцент, в.н.с. Отдела молекулярной генетики Института экспериментальной медицины (г. Санкт-Петербург).
7. Животовский Б.Д. – д.б.н., проф., руководитель лаборатории исследования механизмов апоптоза МГУ (г. Москва).
8. Иллариошкин С.Н. – д.м.н., проф., член-корреспондент РАН, зам. директора по научной работе, зав. отделом исследований мозга Научного центра неврологии (г. Москва).
9. Леонов С.В. – к.б.н., директор по научной работе Центра живых систем, зав. лаборатории разработки инновационных лекарственных средств МФТИ (г. Москва).
10. Макаревич П.И. – к.м.н., зав. лабораторией генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины МГУ (г. Москва).
11. Маргулис Б.А. – д.б.н., г.н.с. лаборатории защитных механизмов клетки Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург).

12. Ребриков Д.В. – д.б.н., проф. РАН, проректор по научной работе Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова (г. Москва).

13. Симонова О.Б. – д.б.н., зав. лабораторией молекулярно-генетических процессов развития ИБР РАН (г. Москва). «Наблюдали ли какие-либо морфологические дефекты у мутантных фибробластов до проведения их перепрограммирования?»

14. Скрябин Н.А. – к.м.н., зав. лабораторией геномики орфанных болезней НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ (г. Томск).

15. Томилин А.Н. – д.б.н., член-корреспондент РАН, зав. лабораторией молекулярной биологии стволовых клеток, ВРИО директора Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). «ткани человека в возрасте 30-50 лет?»

16. Угрюмов М.В. – д.б.н., академик РАН, зав. лабораторией нервных и нейроэндокринных регуляций ИБР РАН (г. Москва).

17. Чуриков Н.А. – д.б.н., проф., зав. лабораторией эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов ИМБ РАН (г. Москва).

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что официальные оппоненты являются компетентными специалистами в области генетики растений, имеют публикации в ведущих биологических журналах и дали своё письменное согласие быть оппонентами. Ведущая организация является одним из ведущих учреждений по изучению физико-химических основ развития социально-значимых заболеваний человека, созданию и внедрению оригинальных методов диагностики, основанных на новых данных о физико-химических закономерностях развития заболеваний человека, а также по разработке и внедрению новых методов лечения, направленных на восстановление внутренней среды организма.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований впервые создана клеточная модель для изучения клеточных процессов при болезни Хантингтона – нейродегенеративного

наследственного заболевания, связанного с нарушением структуры и функции белка хантингтина (HTT). Клеточная модель представлена изогенными линиями дифференцированных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека с удлинённым трактом триплетов CAG в гене *HTT*, которые были внесены с помощью системы редактирования генома CRISPR/Cas9. **Доказано**, что полученные клеточные линии воспроизводят патологический фенотип на ранних этапах развития болезни Хантингтона в нейральных производных стриатума.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что впервые на основе линии эмбриональных фибробластов человека с нормальным числом триплетов CAG в первом экзоне гена *HTT* с помощью системы для редактирования генов CRISPR/Cas9 получены клоны клеток с гомозиготной и гетерозиготной вставкой удлинённого тракта триплетов CAG, экспрессирующие мутантный белок хантингтин. **Показано**, что CRISPR/Cas9 специфично вносит двунитевые разрывы в локус *HTT*.

Изучены свойства клеточных линий, полученных в результате репрограммирования клонов фибробластов с внесённым удлинённым трактом триплетов CAG в гене *HTT*, с помощью стандартных тестов в системе *in vitro*. **Показано**, что в результате репрограммирования фибробластов получены клетки, морфология которых характерна для эмбриональных стволовых клеток, экспрессирующих эндогенную щелочную фосфатазу, а также маркеры плюрипотентности и самообновления – гены *NANOG*, *OCT3/4* и *SOX2*, подтверждающие их плюрипотентный статус.

Изучены свойства клеточных типов, полученных в результате направленной дифференцировки плюрипотентных клеток с изменённым трактом повторов CAG в гене *HTT*. **Показано**, что в результате терминальной дифференцировки получены зрелые нейроны, экспрессирующие ген-маркеры срединных шипиковых нейронов стриатума, такие как *GAD1*, *ARPP21*, *FOXP2*, *DRD1*, *DRD2* и *CALB1*.

Показано, что мутантные клетки воспроизводят патологический фенотип нейронов при болезни Хантингтона, проявляющийся нарушением формирования нейральных розеток, высокой чувствительностью к удалению трофических факторов и сниженным уровнем N-кадгерина на стадии предшественников срединных шипиковых нейронов.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что созданы уникальные изогенные линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека с мутацией, вызывающей болезнь Хантингтона, которые полностью охарактеризованы и могут быть использованы для изучения патогенетических механизмов на ранних стадиях данного заболевания, а также для скрининга новых лекарственных соединений.

Определены оптимальные параметры для эффективной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в срединные шипиковые нейроны стриатума.

Полученные теоретические знания, разработанные методы и подходы, а также клеточные линии, моделирующие начальные стадии болезни Хантингтона, могут быть использованы в научно-исследовательских и медицинских учреждениях, связанных с изучением наследственных патологий человека, в том числе для тестирования потенциальных лекарственных кандидатов без учета влияния генетического фона, а также в образовательном процессе при подготовке специалистов в области генетики, клеточной биологии и регенеративной медицины.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован новый подход к внесению удлиненного тракта триплетов CAG в первый экзон гена *HTT* культивируемых клеток человека, а также классические методы культивирования клеток в сочетании с иммуногистохимическими и молекулярно-генетическими методами, с помощью которых получена и охарактеризована новая модельная система для изучения ранних стадий болезни Хантингтона.

Оценка достоверности результатов исследования выявила высокую воспроизводимость полученных данных и наличие всех необходимых экспериментальных контролей. В работе использованы молекулярно-генетические, цитогенетические и морфологические методики для создания и характеристики клеточной модели заболевания, адекватные поставленным задачам. Результаты экспериментальных этапов работы получены с использованием современного сертифицированного оборудования для флуоресцентной и световой микроскопии, полимеразной цепной реакции в реальном времени и могут быть использованы другими исследователями. Полученные результаты статистически обработаны и достоверны. При обсуждении результатов диссертационной работы о проявлении мутантного фенотипа полученных клеток учитывались данные, описанные ранее другими исследователями по рассматриваемой тематике.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии в сборе исходных данных, планировании и проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных, участии в апробации результатов исследования и подготовке публикаций. Основные результаты получены автором самостоятельно. Донорная последовательность плазмиды с удлинённым трактом триплетов САG сконструирована к.б.н. М.А. Сорокиным. Определение числа триплетов САG в первом экзоне гена *HTT* в клетках проведено к.б.н., с.н.с. Н.Ю. Абрамычевой (ДНК-лаборатория Научного центра неврологии, г. Москва). Анализ результатов иммунофлуоресцентного окрашивания проведен совместно с к.б.н. Е.В. Григорьевой и к.б.н. С.И. Байбородиныным. Приготовление препаратов метафазных хромосом и анализ кариотипа выполнен к.б.н. Ю.В. Мининой. Подготовка материала и электронно-микроскопический анализ выполнен Л.А. Сульдиной.

Полученные соискателем научные результаты соответствуют п. 6 «Молекулярные, иммунологические и физиологические аспекты изучения клеток многоклеточных, малоклеточных и одноклеточных организмов в норме и патологии» и п. 7 «Разработка экспериментальных моделей, методов

цитологической диагностики, морфометрии, маркерной гисто- и цитохимии и др.» паспорта специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки).

Диссертационным советом сделан вывод о том, что диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную работу, соответствует критериям пункта 9, абзац 2 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

На заседании 19 февраля 2020 г. диссертационный совет принял решение присудить Маланхановой Туяне Баировне учёную степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 22 человек, из них 6 докторов наук по специальности, участвующих в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 22, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Председатель диссертационного совета,
Академик РАН



В.К. Шумный

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

19.02.2020 г.