ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.239.01
(Д 003.011.01), СОЗДАННОГО 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 № _____
Решение диссертационного совета от 13 октября 2021 г. № 22

О присуждении Устьянцевой Елизавете Ивановне, гражданке РФ учёной степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Создание и функциональный анализ клеточной модели бокового амиотрофического склероза с помощью генетически-кодируемых биосенсоров» по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, принята к защите 23.06.2021 г. (протокол заседания №12) диссертационным советом 24.1.239.01 (Д 003.011.01), созданным 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 24.1.239.01 (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: Устьянцева Елизавета Ивановна, 11 января 1993 года рождения. В 2015 году окончила Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск.

С 01.10.2015г. по 30.09.2019г. Устьянцева Е. И. обучалась в очной аспирантуре Института Цитологии и Генетики СО РАН, г. Новосибирск. 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: **Медведев Сергей Петрович –** кандидат биологических наук, ведущий 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, главный научный сотрудник и заведующий лабораторией экспериментальной нейроцитологии Отдела исследований мозга федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», г. Москва.

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 отзыве, подписанном научным сотрудником лаборатории клеточной биологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» к.б.н., Лебедевой О. С. и утверждённом ВРИО генерального директора ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» д.б.н., профессором РАН, член-корреспондентом РАН

Лагарьковой М.А., указало, что «диссертационная работа Устьянцевой Елизаветы Ивановны «Создание и функциональный анализ клеточной модели бокового амиотрофического склероза с помощью генетически-кодируемых биосенсоров», является законченной оригинальной работой, научное и практическое значение которой в области генетики, клеточной биологии и цитологии не вызывает сомнений. По своему содержанию, уровню выполнения научных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов полностью отвечает п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», предъявляемым кандидатским диссертациям, а её автор, Устьянцева Елизавета Ивановна, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки). Отзыв на диссертационную работу Устьянцевой Е. И. «Создание и функциональный анализ клеточной модели бокового амиотрофического склероза с помощью генетически-кодируемых биосенсоров» рассмотрен, обсуждён и одобрен единогласно на заседании отдела клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России 25 августа 2021 года, протокол №8»

Соискатель имеет всего 20 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 12 работ общим объемом 67 страниц, из них в рецензируемых научных изданиях (Wos, Scopus) опубликовано 4 работы, 1 глава в коллективной монографии и 7 тезисов в материалах всероссийских и международных конференций. Во всех опубликованных работах личный вклад автора был определяющий. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах.

Наиболее значительные статьи по теме диссертации:

1. Ustyantseva E.I., Medvedev S.P., Vetchinova A.S., Minina J.M., Illarioshkin S.N., and Zakian S.M. Platform for Studying Neurodegeneration Mechanisms Using Genetically Encoded Biosensors // Biochemistry. 2019. Vol. 84. №3. p. 425-435. (Перевод). doi: 10.1134/S000629791903012X (WoS, Scopus)

2. **Ustyantseva E.I.**, Medvedev S.P., Vetchinova A.S., Illarioshkin S.N., Leonov S.V., Zakian S.M. Generation of an induced pluripotent stem cell line, ICGi014-A, by reprogramming peripheral blood mononuclear cells from a patient with homozygous D90A mutation in *SOD1* causing Amyotrophic lateral sclerosis // Stem Cell Res, 2020. Vol. 42, p. 101675. doi: 10.1016/j.scr.2019.101675 (WoS, Scopus)
3. **Ustyantseva E.I.**, Medvedev S.P., Zakian S.M. Studying ALS: current approaches, effect on potential treatment strategy (Book chapter) // Advances in Experimental Medicine and Biology, 2020. Vol. 1241, p. 195-217. doi: 10.1007/978-3-030-41283-8_11 (Scopus)

На диссертацию и автореферат поступило 16 отзывов, все положительные. Отзывы прислали:

1. Александрова М.А. – д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории проблем регенерации ИБР РАН (г. Москва).
2. Волотовский И. Д. – д.б.н., академик НАН Беларуси, главный научный сотрудник института биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси (г. Минск).
3. Глотов А. С. – д.б.н., руководитель отдела геномной медицины ФГБНУ «НИИ АГиР им. Д. О. Отта» (г. Санкт-Петербург). «Какова была эффективность внесения однонулеотидных замен в ген SOD1 и встроек биосенсоров в локус AAVS1 с помощью системы CRSPR/Cas9? Была ли проведена оценка специфичности работы/нецелевой активности системы CRISPR/Cas9? Каковы перспективы и планируемые в продолжение данной работы эксперименты? Каковы на сегодняшний день основные направления развития подходов терапии БАС?»
4. Деев Р. В. – к.м.н., зав. кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Санкт-Петербург). «В связи с отсутствием в автореферате информации о примененной методологии морфометрии, важно узнать у

автора способ измерения линейных параметров нейронов in vitro (как в монослое, так и в матригеле). Применены ли автором иммуноцитохимическе методы верификации результатов получения ИПСК и их направленной дифференцировки? Каковы особенности синтеза специфических продуктов (паттерн распределения, интенсивность и т. п.)? Или автор выполнял только молекулярно-генетическую верификацию результатов индукции дифференцировки?»

5. Животовский Б.Д. – д.б.н., проф., руководитель лаборатории исследования механизмов апоптоза МГУ (г. Москва).

6. Иллариошкин С.Н. – д.м.н., проф., член-корреспондент РАН, зам. директора по научной работе, зав. отделом исследований мозга ФГБНУ «Научный центр неврологии» (г. Москва).

7. Коваленко Л. В. – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патофизиологии и общей патологии БУ ВО Сургутский государственный университет (г. Сургут).

8. Симонова О.Б. – д.б.н., зав. лабораторией молекулярно-генетических процессов развития ИБР РАН (г. Москва).

9. Гершович П.М. – к.б.н., директор департамента разработки геннотерапевтических препаратов ЗАО «БИОКАД» (г. Санкт-Петербург).

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

11. Тоневицкий А. Г. – д.б.н., член-корр. РАН, профессор, декан факультета биологии и биотехнологии национального исследовательского университета Высшая школа экономики. «Для детекции митохондриального H_2O_2 биосенсор должен экспрессироваться непосредственно в митохондриях, так ли это? Каким образом это достигалось и как подтверждалось? Почему при обработке клеток H_2O_2 и глутаматом натрия эксперименты не были проведены в условиях, когда клетки SOD1-G127R оставались жизнеспособными.»

12. Костарева А. А. – д.м.н., директор института молекулярной биологии и генетики ФГБУ «НМИЦ им В. А. Алмазова» (г. Санкт-Петербург).

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

14. Парфенова Е. В. – д.м.н., профессор, заместитель генерального директора, директор Института экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исседовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва).

15. Макаревич П.И. – к.м.н., зав. лабораторией генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины МГУ (г. Москва).

16. Дыбан П.А. – д.м.н., доцент, в.н.с. Отдела молекулярной генетики Института экспериментальной медицины (г. Санкт-Петербург).

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что официальные оппоненты являются компетентными специалистами в области биомедицинских исследований, 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 создана клеточная модель для изучения окислительного стресса, одного из патологических процессов, наблюдаемых при боковом амиотрофическом склерозе (БАС) – генетически гетерогенном нейродегенеративном заболевании, поражающем моторные нейроны. Модель

представлена дифференцированными производными индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека различного происхождения и включает изогенные линии ИПСК с мутациями в гене *SOD1*, в геном которых встроены последовательности биосенсоров для прижизненного измерения уровня перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях клеток.

Доказано, что моторные нейроны с генотипом $SOD1^{G127R/K128X}$ воспроизводят патологический фенотип нейронов при БАС, проявляющийся накоплением перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях, а клеточные линии с встройкой биосенсоров отражают изменения баланса окислительно-восстановительных реакций в моторных нейронах, возникающие вследствие патологической мутации или изменения условий культивирования.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что **изучены** свойства клеточных линий, полученных при репрограммировании мононуклеарных клеток крови пациента с БАС, а также линий ИПСК от здорового человека с мутациями в гене *SOD1*, полученных с помощью системы CRISPR/Cas9. **Показано**, что в процессе репрограммирования получены клетки, отвечающие основным критериям плюрипотентных клеток по морфологии, экспрессии маркеров плюрипотентности и способности к дифференцировке в производные трех зародышевых листков *in vitro*. Также **показано**, что редактирование последовательности гена *SOD1* не повлияло на основные плюрипотентные свойства клеток.

Изучены свойства клеток, несущих встройку биосенсоров окислительного стресса, полученных в результате направленной дифференцировки ИПСК. **Показано**, что в результате терминальной дифференцировки получены зрелые спинальные моторные нейроны, экспрессирующие гены-маркеры моторных нейронов, такие как *ChAT*, *MNX1* и *ISL1*. **Показано**, что в процессе дифференцировки промотор биосенсора подвергается инактивации если его экспрессия не поддерживается регулярным добавлением доксициклина.

Изучены функциональные свойства биосенсоров перекиси водорода, экспрессирующихся в зрелых спинальных моторных нейронах, происходящих из различных линий ИПСК, в том числе с мутациями в гене *SOD1*. **Показано,** что биосенсоры отражают динамику изменения уровня перекиси водорода в митохондриях и цитоплазме моторных нейронов, возникающего в результате введения мутаций в ген *SOD1* или при изменении условий культивирования, а также в цитоплазме нейронов при индукции глутаматной эксайтотоксичности.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован широкий спектр методов клеточной биологии, молекулярно-генетических и иммуногистохимических методов, включая культивирование и репрограммирование мононуклеарных клеток крови человека, получение ИПСК и их дифференцировка в моторные нейроны, а также методы направленного редактирования генов с помощью системы CRISPR/Cas9, позволившие получить линии ИПСК с мутациями в гене *SOD1* и со встроенными в локус *AAVS1* биосенсорами перекиси водорода. Для изучения свойств клеточных линий, моделирующих фенотипические проявления БАС, связанные с окислительным стрессом, использован новый подход к изучению баланса окислительно-восстановительных реакций в культивируемых моторных нейронах с помощью генетически кодируемых биосенсоров перекиси водорода**.**

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что впервые **созданы** уникальные изогенные линии ИПСК человека с однонуклеотидными заменами в 4 и 5 экзонах хотя бы одного из аллелей гена *SOD1*, воспроизводящие фенотипические проявления патологии, характерные для БАС.

Впервые на основе пациент-специфичных линий ИПСК человека и изогенных линий с мутациями в *SOD1* **созданы** линии, несущие встройки биосенсоров окислительного стресса Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1,

адекватно отражающие изменения в уровне перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях, соответственно.

Созданные клеточные линии могут быть использованы для изучения роли окислительного стресса в развитии бокового амиотрофического склероза, а также для скрининга и/или тестирования потенциальных лекарственных препаратов без учета влияния генетического фона. Подходы, примененные в работе, могут быть использованы для создания клеточных моделей аналогичных заболеваний или для исследования других клеточных процессов.

Полученные теоретические знания, разработанные методы и подходы, а также клеточные линии, созданные в процессе выполнения работы, могут быть использованы в научно-исследовательских и медицинских учреждениях, связанных с изучением наследственных патологий человека, а также в образовательном процессе при подготовке специалистов в области генетики, клеточной биологии и регенеративной медицины.

Оценка достоверности результатов исследования выявила их высокую надежность, а наличие экспериментальных контролей в виде линий ИПСК, полученных от здорового донора и пациента с БАС, позволило реконструировать патологический фенотип заболевания с помощью мутаций в гене *SOD1* и создать модельную систему для изучения роли окислительного стресса в развитии БАС. Результаты исследования статистически обработаны, достоверны и могут быть использованы другими исследователями. При обсуждении результатов работы, касающихся фенотипических особенностей созданных линий ИПСК и функционирования генетически кодируемых биосенсоров в культивируемых моторных нейронах, учитывались данные, полученные ранее другими исследователями по рассматриваемой тематике.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных, участии в апробации результатов

исследования и подготовке публикаций. Основные результаты получены автором самостоятельно. Линия ИПСК от здорового донора получена к.б.н. А.А. Малаховой. Донорные последовательности плазмид, кодирующие биосенсоры перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях, сконструированы к.б.н. С.П. Медведевым. Мононуклеарные клетки крови выделены и заморожены А. С. Ветчиновой (Научный центр неврологии, г. Москва). Приготовление препаратов метафазных хромосом и анализ кариотипа выполнен к.б.н. Ю.В. Мининой.

В ходе защиты диссертации критических замечаний высказано не было. Соискатель Устьянцева Е. И. аргументировано ответила на все задаваемые ей в ходе заседания вопросы.

На заседании 13.10.2021 диссертационный совет принял решение присудить Устьянцевой Е. И. ученую степень кандидата биологических наук за создание клеточной модели бокового амиотрофического склероза и ее исследование с помощью генетически-кодируемых биосенсоров.

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

Зам. Председателя
диссертационного совета,
доктор биологических наук Н.Б. Рубцов

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук Т.М. Хлебодарова

13.10.2021 г.