

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.239.01,
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 № _____
Дата защиты 27 октября 2021 г. протокол № 23

О присуждении Живень Марии Константиновне (гражданке РФ)
учёной степени кандидата биологических наук

Диссертация «Модуляция экспрессии гена *HIF2A* в плюрипотентных стволовых клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9» по специальности 1.5.7. – генетика, принята к защите 14 июля 2021 г, протокол №15, Диссертационным советом 24.1.239.01 (Д003.011.01) 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 – Живень Мария Константиновна, 11.01.1991 года рождения. В 2015 году окончила Факультет естественных наук Новосибирского государственного университета, г. Новосибирск.

С 01.09.2015 г. по 31.08.2019 г. Живень Мария Константиновна обучалась в очной аспирантуре в Институте цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск. В период подготовки диссертации работала младшим научным сотрудником сектора постгеномной нейробиологии ИЦиГ СО РАН. В настоящее время работает биологом в Центре новых медицинских технологий, г. Новосибирск.

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 – Захарова Ирина Сергеевна – кандидат биологических наук, 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, заведующий лабораторией экспериментальной нейрцитологии 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 ФГБУН 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 положительном заключении, подписанном к.б.н., ведущим научным сотрудником лаборатории клеточной биологии ФГБУН «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» Богомазовой А.Н. и утверждённом ВРИО генерального директора ФГБУ «Федеральный научно-

клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» член-кор. РАН, д.б.н. Лагарьковой Марией Андреевной, указано, что «Диссертационная работа Живень Марии Константиновны «Модуляция экспрессии гена *HIF2A* в плюрипотентных стволовых клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9», представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – «генетика», 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, Живень М.К., заслуживает присуждения искомой степени. Отзыв на диссертационную работу и автореферат Живень Марии Константиновны был рассмотрен, обсуждён и одобрен на заседании отдела клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России (протокол заседания №9 от 30 сентября 2021 г.)».

Соискатель имеет всего 25 публикаций, по теме диссертации 14 публикаций (общим объемом 77 стр), в том числе 2 статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях (Wos, Scopus), 1 статья в рецензируемом научном журнале, 9 тезисов в материалах всероссийских и международных конференций, 2 главы в монографии.

Наиболее значительные статьи по теме диссертации:

1. Живень М.К., Захарова И.С., Шевченко А.И., Елисафенко Е.А., Орищенко К.Е., Закиян С.М. Получение и характеристика эмбриональных стволовых клеток человека с повышенной экспрессией *HIF2A* // Гены & Клетки. – 2020. – Т. 14. – №1. – С. 29-35. (Scopus)
2. Zakharova I.S., Zhiven' M.K., Saaya S.B., Shevchenko A.I., Smirnova A.M., Strunov A., Karpenko A.A., Pokushalov E.A., Ivanova L.N., Makarevich P.I.,

Parfyonova Y.V., Aboian E., Zakian SM. Endothelial and smooth muscle cells derived from human cardiac explants demonstrate angiogenic potential and suitable for design of cell-containing vascular grafts // Journal of Translational Medicine. – 2017. – V. 15. – № 1. – e 54.(WoS, Scopus)

3. Живень М.К., Захарова И.С., Шевченко А.И., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Гетерогенность клеток эндотелия // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2015. – Т. 19. – № 4-2. – С. 104-112.

На диссертацию и автореферат поступило 7 отзывов, все положительные. Отзывы прислали:

1. Смирнихина Светлана Анатольевна, заведующая лабораторией редактирования генома, Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, г. Москва.

2. Лактионов Павел Петрович, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной медицины, ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск.

3. Повещенко Ольга Владимировна, руководитель лаборатории клеточных технологий, НИИКЭЛ, г. Новосибирск

4. Сметанина Мария Александровна, научный сотрудник лаборатории фармакогеномики ИХБФМ СО РАН, г. Новосибирск «В представленной в автореферате работе были технические замечания. В п.6 разделе «Результаты и обсуждения» автор заявляет, что им «проанализированы ферменты гликолитического пути и ферменты, вовлеченные в окислительные процессы, происходящие в митохондриях» и ссылается на рис.7 (на котором названия генов не выделены курсивом); однако анализ экспрессии был выполнен для генов этих ферментов, не белковых продуктов генов.»

5. Макаревич Павел Игоревич, зав. лаб. генно-клеточной терапии Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва. «В качестве потенциального ограничения работы может рассматриваться *in vitro* оценка

ангиогенных свойств полученных эндотелиальных клеток. Однако этот вопрос с точки зрения разработки должен решаться на этапе доклинических исследований и отсутствие в данной работе релевантной животной модели не умоляет ее качества и важности.»

6. Дыбан Павел Андреевич, ведущий научный сотрудник Отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», г. Санкт-Петербург.

7. Назаренко Мария Сергеевна, руководитель лаборатории популяционной генетики Научно-исследовательского института медицинской генетики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», г. Томск.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что официальные оппоненты являются компетентными специалистами в области генетики, 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 созданы с помощью системы направленного редактирования генома CRISPR/Cas9 генетически модифицированные линии эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека с делециями части гена

фактора инициации трансляции *EIF3E* (Eukaryotic Initiation Factor 3 subunit E), моделирующие состояние гипоксии.

Доказано, что линии ЭСК человека с супрессией гена *EIF3E* имеют стабильно повышенный уровень экспрессии гена транскрипционного фактора HIF2A (Hypoxia Inducible Factor 2A), а их дифференцированные эндотелиальные производные демонстрируют повышенный ангиогенный потенциал.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что впервые **изучена** возможность регуляции экспрессии гена *HIF2A* посредством супрессии гена его ингибитора *EIF3E* в эмбриональных стволовых клетках человека.

Показано, что протяженные делеции в области промотора и первого экзона гена *EIF3E* приводят к стабильному повышению уровня мРНК HIF2A в субклонах H9 ($\Delta 219$ п.н.) и E12 ($\Delta 226$ п.н.) ЭСК и количества белка HIF2A в субклоне E12. **Показано**, что супрессия гена *EIF3E* влияет также на энергетический метаболизм ЭСК человека и в субклоне E12 приводит к повышению уровня экспрессии генов гликолитического пути *PDHX*, *PDK1* и митохондриальных генов *MT-ND1*, *MT-CO1*.

Изучено влияние супрессии гена *EIF3E* на эффективность направленной дифференцировки ЭСК и ангиогенные свойства дифференцированных эндотелиальных производных. **Показано**, что в эндотелиальных производных субклонов H9 и E12 ЭСК с делецией гена *EIF3E* повышена экспрессия генов раннего мезодермального маркера *Brschuury* и эндотелиальных маркеров VEGFR2 и CD31, а также генов *ANG1*, *bFGF*, *VEGFR2* и *CXCR4* проангиогенных факторов.

Показано также, что эндотелиальные производные генетически модифицированных субклонов ЭСК обладают повышенной способностью к формированию трехмерных капилляроподобных структур на матригеле *in vitro*.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что впервые созданы уникальные линии ЭСК человека с помощью системы CRISPR/Cas9, несущие протяженную делецию в одном из аллелей гена *EIF3E*, которые имитируют состояние гипоксии через активацию экспрессии гена регуляторного фактора HIF2A. Эндотелиальные производные этих линий характеризуются повышенной способностью к формированию сосудоподобных структур и могут быть использованы для изучения роли факторов, индуцируемых гипоксией, в регуляции ангиогенеза, а также при разработке подходов к стимуляции ангиогенеза при ишемических поражениях тканей.

Полученные теоретические знания и разработанные технологии, а также клеточные линии, созданные в процессе выполнения работы, могут быть использованы в научно-исследовательских и медицинских учреждениях, связанных с фундаментальными исследованиями в области регенеративной медицины, в том числе применяющих методы редактирования геномов и направленной дифференцировки ЭСК, а также в образовательном процессе при подготовке специалистов в области генетики, молекулярной и клеточной биологии, физиологии.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован широкий спектр методов клеточной биологии, молекулярно-генетических и иммуногистохимических методов, включая культивирование, получение ЭСК человека, их дифференцировку в эндотелиальные клетки, цифровую ПЦР, вестерн-блот, секвенирование по Сенгеру и проточную цитометрию, а также метод направленного редактирования генов с помощью системы CRISPR/Cas9, позволивших получить генетически модифицированные линии ЭСК с делецией участка гена *EIF3E* и изучить свойства их эндотелиальных производных.

Оценка достоверности результатов исследования выявила их высокую надежность, а наличие экспериментальных контролей к генетически

модифицированным ЭСК, культивируемых в условиях реальной гипоксии и с веществами-миметиками гипоксии, позволило проанализировать экспрессию генов *EIF3E*, *HIF1A* и *HIF2A*, оценить эффективность эндотелиальной дифференцировки, экспрессию генов факторов ангиогенеза и количество сосудоподобных структур в тесте на ангиогенез *in vitro*. Результаты статистически обработаны, достоверны и могут быть использованы другими исследователями. При обсуждении результатов диссертационной работы, касающихся регуляции экспрессии гена *HIF2A*, учитывались данные, полученные ранее другими исследователями по рассматриваемой тематике.

Личный вклад автора заключается в конструировании плазмидных векторов, получении генетически модифицированных ЭСК и их направленной дифференцировке в эндотелиальные производные, планировании и проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных, участии в подготовке публикаций. Анализ кариотипа субклонов Н9 и Е12 выполнен Тарховой Н.Б. (Медико-генетический центр Института медицинской генетики ФГБУ «Томский медицинский центр РАН»), вестерн-блот анализ *HIF2A* в субклонах ЭСК проведен Ступниковой А.С. и Байрамовой Д.О. (ИЦиГ СО РАН).

В ходе защиты диссертации принципиальных критических замечаний высказано не было. Замечания, высказанные в ходе дискуссии в основном касались оформления диссертации и стилистики текста. Соискатель Живень М.К. аргументировано ответила на все задаваемые ей в ходе заседания вопросы.

На заседании 27 октября 2021 г. диссертационный совет принял решение присудить Живень М.К. учёную степень кандидата биологических наук за **решение научной задачи**, связанной с разработкой новых технологических подходов к регуляции ангиогенеза с помощью генетически модифицированных ЭСК человека, имеющей значение для различных областей биомедицины.

