

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Государственного научного центра Российской Федерации
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 22 января 2025 года № 1

О присуждении **Овчинниковой Лейле Александровне**, гражданке РФ, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация “Структурно-функциональный анализ В-клеточного репертуара при рассеянном склерозе” по специальности 1.5.3 “Молекулярная биология” принята к защите 19 ноября 2024 года (протокол заседания № 25) Диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН) (117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г., а также Приказа Минобрнауки России № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Овчинникова Лейла Александровна, 10 февраля 1994 года рождения. В 2018 году соискатель окончила "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации по специальности 30.05.02 медицинская биофизика. В 2022 году соискатель окончила аспирантуру ГНЦ ИБХ РАН по направлению 06.06.01 Биологические науки с квалификацией «Исследователь. Преподаватель-исследователь». В настоящее время работает младшим научным сотрудником в лаборатории биокатализа ГНЦ ИБХ РАН.

Диссертация выполнена в лаборатории биокатализа отдела белково-пептидных технологий ГНЦ ИБХ РАН.

Научный руководитель – кандидат биологических наук, **Ломакин Яков Анатольевич** (старший научный сотрудник лаборатории биокатализа ГНЦ ИБХ РАН).

Официальные оппоненты:

Филатов Александр Васильевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения “Государственный научный центр “Институт иммунологии” Федерального медико-биологического агентства; **Тикунова Нина Викторовна**, доктор биологических

наук, заведующая лабораторией молекулярной микробиологии Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, дали **положительные** отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук в своем **положительном** отзыве, подписанном Рубцовым Петром Михайловичем, доктором биологических наук, профессором, главным научным сотрудником лаборатории клеточных основ развития злокачественных заболеваний, и утвержденном директором академиком РАН, доктором биологических наук Георгиевой Софией Георгиевной, указала, что диссертационная работа Овчинниковой Лейлы Александровны соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539; 26.09.2022 г. № 1690; 26.01.2023 г. № 101; 25.01.2024 № 62), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Соискатель имеет 18 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 7 работ, все опубликованы в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы данных Web of Science, Scopus и/или РИНЦ). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы, по теме в которые Овчинникова Л. А. внесла основной либо существенный вклад, включают:

1. Lomakin Y.A., **Ovchinnikova L.A.**, Terekhov S.S., Dzhelad S.S., Yaroshevich I., Mamedov I., Smirnova A., Grigoreva T., Eliseev I.E., Filimonova I.N., Mokrushina Y.A., Abrikosova V., Rubtsova M.P., Kostin N.N., Simonova M.A., Bobik T.V., Aleshenko N.L., Alekhin A.I., Boitsov V.M., Zhang H., Smirnov I.V., Rubtsov Y.P., Gabibov A.G. Two-dimensional high-throughput on-cell screening of immunoglobulins against broad antigen repertoires // **Commun. Biol**, 2024. V.7., № 842.
2. **Овчинникова Л.А.**, Джелад С.С., Симанив Т.О., Захарова М.Н., Габибов А.Г., Ломакин Я.А. Уровень противовирусных антител к белку EBNA-1 в сыворотке крови пациентов с рассеянным склерозом не зависит от тяжести заболевания // **Доклады российской академии наук. Науки о жизни**, 2024. Т. 515., С. 92–96.
3. Lomakin Y.A., Zvyagin I.V., **Ovchinnikova L.A.**, Kabilov M.R., Staroverov D.B., Mikelov A., Tupikin A.E., Zakharova M.Y., Bykova N.A., Mukhina V.S., Favorov A.V., Ivanova M., Simaniv T., Rubtsov Y.P., Chudakov D.M., Zakharova M.N., Illarioshkin S.N., Belogurov A.A., Gabibov A.G. Deconvolution of B cell receptor repertoire in multiple sclerosis patients revealed a delay in tBreg maturation // **Front Immunol**, 2022. V.13.
4. **Ovchinnikova L.A.**, Zalevsky A.O., Lomakin Y.A. Extracellular Vesicles in Chronic Demyelinating Diseases: Prospects in Treatment and Diagnosis of Autoimmune Neurological Disorders // **Life (Basel)**, 2022. V.12., № 11.

5. Ломакин Я.А., **Овчинникова Л.А.**, Захарова М.Н., Иванова М.В., Симанив Т.О., Кабилов М.Р., Быкова Н.А., Мухина В.С., Каминская А.Н., Тупикин А.Е., Захарова М.Ю., Фаворов А.В., Иллариошкин С.Н., Белогуров А.А., Габибов А.Г. Смещение репертуара генов зародышевой линии В-клеточных рецепторов при рассеянном склерозе // *Acta Naturae*, 2022. Т. 14., № 4. С. 84–93.
6. Terekhov S.S., Eliseev I.E., **Ovchinnikova L.A.**, Kabilov M.R., Prjibelski A.D., Tupikin A.E., Smirnov I.V., Belogurov A.A., Severinov K.V., Lomakin Y.A., Altman S., Gabibov A.G. Liquid drop of DNA libraries reveals total genome information. // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. V. 117., № 44. P. 27300-27306.
7. Ishina I.A., Filimonova I.N., Zakharova M.Y., **Ovchinnikova L.A.**, Mamedov A.E., Lomakin Y.A., Belogurov A.A. Exhaustive Search of the Receptor Ligands by the CyCLOPS (Cytometry Cell-Labeling Operable Phage Screening) Technique // *Int J Mol Sci*, 2020. V. 21., № 17.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв **официального оппонента** д.б.н. **Тикуновой Нины Викторовны**. Отзыв *положительный*, содержит следующие замечания и вопросы:

- 1) Термин “фаг-дисплейная библиотека” является прямой калькой с английского языка, вошедшей в лабораторный слэнг, и правильнее было бы использовать термин “комбинаторная фаговая библиотека пептидов/антител”, давно введенный в русскоязычную научную литературу.
- 2) Если при идентификации кандидатных маркеров РС на основе Phip-Seq наибольшее количество различных эпитопов обнаружено для нинеина, то почему в дальнейших экспериментах (исследование реактивности сывороток) эти пептиды не рассматривались.

Отзыв **официального оппонента** д.б.н. **Филатова Александра Васильевича**.

Отзыв *положительный*, содержит следующие замечания и вопросы:

- 1) Овчинниковой Л.А. была создана фаговая библиотека аутоантигенов человека, которая содержала перекрывающиеся пептиды длиной 44 аминокислотных остатков. Вероятно, эти пептиды моделируют только линейные эпитопы. Хочется пожелать автору продолжить свое исследование с использованием более протяженных пептидов, которые способны моделировать также и конформационные эпитопы.
- 2) В работе были получены RBD-связывающие антитела Vac-3.1 и Vir-1.7. Необходимо было указать какой вариант SARS-CoV-2 был использован для получения этих антител.
- 3) В Выводе 5 слово «репертуар» стоит не на своем месте.
- 4) На стр. 129 сказано, что «в генах зародышевых линий тяжёлых и лёгких каппа цепей в области переменных фрагментов у пациентов с РС содержится меньше мутаций по сравнению со здоровыми донорами». По все вероятности речь идет не о мутациях в зародышевой линии, а о соматических гипермутациях.

- 5) В тексте диссертации встречаются некоторые неудачные обороты. Например, «У пациентов с РС повышен сывороточный титр tBreg с фенотипом» (стр. 120); «Существование нескольких альтернативных методов дифференцировки Breg» (стр. 119).

Отзыв **ведущей организации**. Отзыв *положительный*. Принципиальных замечаний по диссертации нет. Имеется комментарий к работе:

В работе описывается создание платформы для поиска антиген-специфичных антител. Верификация данной платформы проводилась на вирусных антигенах. Использование данной платформы для поиска аутоантител при рассеянном склерозе существенно улучшило бы данную работу.

Отзыв **на автореферат** к.б.н., м.н.с. лаборатории системной биологии Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича (ИБМХ) **Вавилова Никиты Эдуардовича**. Отзыв *положительный*, содержит следующие замечания и вопросы:

- 1) В работе используется не совсем корректная формулировка: «...разработан и оптимизирован метод амплификации сложных ДНК-матриц в каплях эмульсии... С использованием данного метода создана пептидная фаг-дисплейная библиотека», однако с помощью метода амплификации ДНК не могут быть получены пептиды.
- 2) В разделе с описанием подбора условий для эмПЦР не приведены количественные показатели для каждой комбинации условий, например можно было привести показатели распределения и покрытия, что облегчило бы понимание выбора именно этих условий для читателя.
- 3) В приведенном ROC-анализе используется несколько комбинаций впервые предлагаемых маркеров, однако интересно посмотреть их в сравнении с уже существующими маркерами и сравнить показатели чувствительности и специфичности полученных классификаторов.

Отзыв **на автореферат** к.б.н., м.н.с. лаборатории молекулярной нейрогенетики и врожденного иммунитета Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» **Маркова Дмитрия Дмитриевича**. Отзыв *положительный*, содержит следующее замечание:

В качестве замечания, не снижающего общего впечатления от работы, отмечу, что рассеянный склероз характеризуется воспалением в центральной нервной системе и для его диагностики в том числе исследуют спинномозговую жидкость. Исследование антительного ответа в спинномозговой жидкости пациентов с рассеянным склерозом могло бы дополнить данную работу.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в области молекулярной биологии и иммунологии, которые подтверждены сериями их публикаций в ведущих российских и международных журналах. В ведущей организации – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук – ведутся исследования в области иммунологии, механизмов клеточного иммунитета. Официальный оппонент Тикунова Нина Викторовна является ведущим специалистом в области молекулярной биологии, специализируется в разработке иммунотерапевтических препаратов нового поколения. Официальный оппонент Филатов Александр Васильевич является специалистом в области дифференцировочных антигенов лейкоцитов человека и моноклональных антител. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяют им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований впервые выявлены 3 ранее не ассоциированных с рассеянным склерозом (РС) кандидатных антигена: альфа цепь спектрина 1 (SPTAN1₆₀₁₋₆₄₄), периаксин (PRX₄₅₁₋₄₉₄), тирозинкиназа-6 (РТК6₃₀₁₋₃₄₄). Предложена панель антигенов, позволяющая с высокой чувствительностью верифицировать РС. Разработан и оптимизирован метод амплификации сложных ДНК-матриц в каплях эмульсии, позволяющий добиться уменьшения количества ПЦР-ошибок и увеличения выхода продукта реакции. Разработана платформа, позволяющая осуществлять высокопроизводительный скрининг антиген-специфичных иммуноглобулинов. Детально исследована субпопуляция tBreg при РС, что позволило предположить, что развитие данного заболевания сопряжено с замедленным созреванием субпопуляции tBreg, что подтверждено пониженным содержанием гипермутаций в вариабельных фрагментах репертуара тяжёлых цепей иммуноглобулинов данной субпопуляции.

Теоретическая значимость исследования состоит в том, что результаты проведенной работы расширяют понимание молекулярных механизмов развития РС, и углубляют знания о гетерогенности аутоиммунного ответа при данном заболевании, а также о роли В-клеток в его формировании. Автором охарактеризован профиль иммунного ответа В-клеток периферической крови пациентов с РС и здоровых доноров и выявлены новые, ранее не ассоциированные с РС потенциальные аутоантигены. Автором было исследовано содержание tBreg, В-клеток памяти, наивных В-клеток и В-регуляторных клеток памяти в периферической крови пациентов с рассеянным склерозом. Автором были проанализированы последовательности В-клеточных рецепторов tBreg и обнаружено снижение уровня соматических гипермутаций в генах, кодирующих

вариабельные фрагменты тяжелых цепей иммуноглобулинов у пациентов с РС. На основании полученных результатов было выдвинуто предположение о том, что развитие РС сопряжено с замедленным созреванием субпопуляции tBreg.

Значение полученных соискателем результатов исследования для **практики** состоит в том, что полученные новые данные о механизмах развития РС могут быть использованы при разработке эффективных методов терапии и ранней диагностики РС. Созданная автором комбинаторная фаговая библиотека белков человека, ассоциированных с аутоиммунными патологиями, готова для использования при профилировании антительного ответа и поиска потенциальных аутоантигенов у пациентов с другими аутоиммунными заболеваниями (такими как системная красная волчанка, диабет 1 типа). Оптимизированный автором метод эмульсионной ПЦР в его сегодняшнем виде готов для использования при амплификации сложных матриц ДНК при создании комбинаторных библиотек антигенов. Разработанная автором платформа для скрининга антиген-специфичных иммуноглобулинов может использоваться для отбора высокоэффективных терапевтических антител.

Достоверность результатов исследования сомнений не вызывает: исследования проводились с использованием современных научных методов, экспериментальные данные были получены с использованием сертифицированного оборудования, воспроизводимость результатов неоднократно продемонстрирована, при анализе данных были использованы современные методы сбора и обработки информации.

Личный вклад Овчинниковой Лейлы Александровны в представленной диссертационной работе заключался в планировании и проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, литературном поиске, а также в подготовке материалов научных публикаций. Основные эксперименты по оптимизации протоколов и постановке эмульсионной ПЦР, созданию комбинаторной фаговой библиотеки потенциальных аутоиммунных мишеней человека, анализу антител из сывороток крови пациентов с РС, поиску потенциальных мишеней аутоиммунной агрессии у пациентов с РС, цитофлуориметрическому анализу В-клеточных субпопуляций пациентов с РС и здоровых доноров, описанные в диссертации, выполнены лично автором. Работа по изучению амплификации сложных матриц ДНК выполнена в соавторстве с Елисеевым И.Е. Автором диссертации были разработаны методы эмульсификации и подобраны условия амплификации, проведен количественный анализ продуктов. Елисеевым И.Е. был проведен анализ данных секвенирования следующего поколения (NGS) для библиотек, изучены ошибки в фрагментах ДНК и построена теоретическая модель, описывающая процесс амплификации. Работа по скринингу лиганд-рецепторных взаимодействий выполнена в соавторстве с Ишиной И.А. Автором лично были получены результаты экспериментов по подбору фагового вектора fADL и

верификации специфичности связывания комбинаторных фаговых библиотек с эукариотическими клетками линии Raji, описываемые в данной работе.

Диссертационный совет 24.1.037.01 заключил, что диссертационная работа Овчинниковой Лейлы Александровны является законченной научно-квалификационной работой. Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты и по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология». Таким образом диссертационная работа Овчинниковой Лейлы Александровны «Структурно-функциональный анализ В-клеточного репертуара при рассеянном склерозе», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология», соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 г. № 1539; 26.09.2022 г. № 1690; 26.01.2023 г. №101; 25.01.2024 № 62).

В ходе защиты диссертации были высказаны следующие критические замечания:

1. Каким образом можно связать функцию идентифицированных белков с течением заболевания?
2. Какое новое знание дает открытие новых антигенов при рассеянном склерозе?
3. В чем измерялась частота соматических гипермутаций?

Соискатель Овчинникова Л.А. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию.

1. Известно, что периаксин – белок периферической нервной системы. Возможно, что уровень периаксина и спектрина повышается в следствие воспаления в нервной системе. Разрушаются компоненты нервной системы и такие белки становятся доступны для иммунной системы. Антитела к данным аутоантигенам были идентифицированы в основном у пациентов с активным рассеянным склерозом, возможно их появление — это последствие длительного воспалительного процесса.
2. С появлением более чувствительных методов диагностики и увеличением выборок исследованных доноров у пациентов с рассеянным склерозом стали выявлять антитела к немиелиновым антигенам. Идентификация новых панелей аутоантигенов при рассеянном склерозе способна прояснить этиологию данного заболевания, которая до конца до сих пор неизвестна. Изучая иммунный ответ при данном заболевании, можно понять какие компоненты страдают при воспалении при рассеянном склерозе.
3. Частота соматических гипермутаций выражалась в процентном содержании гипермутаций по сравнению с исходным гермлайном.

На заседании 22 января 2025 года диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по изучению особенностей репертуаров В-клеток и поиску новых потенциальных аутоантигенов при рассеянном склерозе, имеющей важное значение для исследований в области молекулярной биологии и медицины, присудить **Овчинниковой Лейле Александровне** ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 7 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3. - Молекулярная биология, участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета



академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

22.01.2025 г.