

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации **Маланхановой Туяны Баировны** на тему

«СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.04 - клеточная биология, цитология, гистология».

Для изучения молекулярных механизмов развития нейродегенеративных наследственных заболеваний, в частности болезни Хантингтона (БХ), необходимы модельные системы, которые наиболее точно воспроизводят фенотип заболевания. Модели на основе культивируемых клеток человека являются перспективным объектом для таких исследований. Наиболее точную картину патологических процессов, происходящих при БХ, можно создать с помощью нейрональных производных, в частности срединных шипиковых нейронов (СШН), полученных при направленной дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток человека. Разработка технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) открыла новые возможности моделирования заболеваний, поскольку стало возможным получение клеточных моделей от конкретного пациента. Однако, наличие однонуклеотидных полиморфизмов в геноме клеток от разных пациентов может вносить существенный вклад в результаты исследований. Необходима большая выборка клеток от пациентов и «здоровых» доноров, что значительно усложняет работы по изучению заболевания.

В диссертационной работе **Маланхановой Туяны Баировны** была **поставлена цель** - создать и охарактеризовать модельную систему болезни Хантингтона на основе изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека.

Для достижения указанной цели автором работы были поставлены **конкретные задачи**: 1. Создать систему для внесения удлиненного тракта триплетов CAG (>36) в экзон 1 гена *HTT* человека на основе донорной плазмиды и плазмиды, экспрессирующей элементы системы CRISPR/Cas9, и оценить эффективность ее работы на клетках линии НЕК293. 2. Внести удлиненный тракт триплетов CAG в экзон 1 гена *HTT* эмбриональных фибробластов человека и репрограммировать клоны внесенной мутацией к плюрипотентному состоянию. 3. Провести характеристику клонов ИПСК с мутацией в гене *HTT* с помощью стандартных тестов на плюрипотентность. 4. Провести направленную дифференцировку ИПСК с мутацией в гене *HTT* и контрольной изогенной линии ИПСК в срединные шипиковые нейроны стриатума и охарактеризовать мутантный фенотип полученных нейронов.

Для реализации поставленных задач были использованы самые современные методы и подходы молекулярной генетики, молекулярной и клеточной биологии, которые в настоящее время широко используются во многих лабораториях мира для выполнения такого рода исследований.

Впервые получена клеточная система, моделирующая болезнь Хантингтона, на основе линий ИПСК, несущих 40/53 и 69/22 повторов CAG в первом экзоне гена *HTT*, и изогенной линии ИПСК без мутации. Удлиненный тракт повторов CAG, вызывающий данное заболевание, был внесен с помощью системы CRISPR/Cas9 и гомологичной рекомбинации с донорной матрицей, которая была сконструирована в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН. Подтвержден плюрипотентный статус полученных клеточных линий с помощью ряда стандартных тестов. Кроме того, была проведена проверка активности CRISPR/Cas9 в нецелевых локусах генома клеток с помощью секвенирования по Сэнгеру. По протоколу, разработанному в лаборатории эпигенетики развития под руководством профессора Закиян С.М., проведена направленная дифференцировка полученных клеточных линий, изогенного контроля и положительного контроля – линия пациент-специфичных ИПСК с 47/17 повторами CAG в первом экзоне гена *HTT*, в СШН стриатума. Полученные нейроны экспрессировали основные маркеры зрелых нейронов стриатума и воспроизводили патологический фенотип БХ. Более того, были выявлены новые ультраструктурные особенности мутантных нейронов с помощью электронной микроскопии.

Полученная диссертантом изогенная модельная система может быть использована для проведения комплексных исследований молекулярно-генетических и клеточных механизмов развития БХ, а также проводить скрининговые тестирования фармакологических препаратов. Кроме того, результаты, стратегии и подходы, использованные в данной работе, могут быть применены при создании изогенных клеточных моделей целого ряда полиглутаминовых заболеваний человека, поскольку для этого необходима только замена плечей гомологии донорного вектора и подбор нового протоспейсера для действия системы CRISPR/Cas9.

На основании проведенной работы сформулированы выводы, которые полностью отражают полученные результаты:

1. Создана система для проведения гомологичной рекомбинации в экзоне 1 гена *HTT*, состоящая из генетической конструкции, экспрессирующей элементы системы CRISPR/Cas9, и донорные генетические конструкции, содержащие 69 и 148 триплетов CAG
2. Эффективность работы созданной системы проверена на клетках линии HEK293FT, в результате чего получено два клона, HEK293-F1 (148Q/148Q) и HEK293-B5 (69Q/ Δ *HTT*), с гомо- и гетерозиготной встройкой удлиненного тракта триплетов CAG, и показана экспрессия мутантного хантингтина с помощью анализа вестерн-блот.
3. С помощью созданной системы получено 23 клона эмбриональных фибробластов человека с мутацией в гене *HTT*.
4. Клоны фибробластов 2D12 (69Q/20Q) и 3D8 (53Q/40Q) были перепрограммированы к плюрипотентному состоянию с использованием эписомных векторов, в результате чего было получено 11 и 2 линии ИПСК соответственно.

5. Показано, что полученные линии ИПСК экспрессируют основные маркеры плюрипотентных клеток, при спонтанной дифференцировке в эмбрионидных тельцах образуют типы клеток трех примитивных зародышевых листков и имеют кариотип близкий к норме.
6. В результате направленной дифференцировки ИПСК с мутацией в гене *HTT* получены нейроны, экспрессирующие гены-маркеры СШН стриатума, такие как *GAD1*, *ARPP21*, *FOXP2*, *DRD1*, *DRD2* и *CALB1*.
7. Мутантные клетки демонстрировали патологический фенотип, наблюдающийся при БХ: нарушенное формирование нейральных розеток, высокая чувствительность к удалению трофических факторов и сниженный уровень N-кадгерина на стадии предшественников СШН, ультраструктурные нарушения терминально дифференцированных СШН

Результаты исследований, по теме диссертации представлены в 5 публикациях, опубликованных в научных журналах и трудах международных конференций. В публикациях полностью отражены материалы, включенные в диссертацию.

Работа является законченным научно-квалификационным исследованием, отличающимся новизной и имеющим практическую ценность. Диссертация Маланхановой Туяны Баировны «СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА», соответствует требованиям п.9.абзац 2 « Положения о присуждении ученых степеней», а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.04 - клеточная биология, цитология, гистология.

Берсимбай Рахметкажи Искендинович

академик НАН РК, доктор биологических наук, профессор



Заведующий кафедрой общей биологии и геномики, директор Института клеточной биологии и биотехнологии Евразийского национального университета им.Л.Н.Гумилева

Место работы: ЕНУ им.Л.Н.Гумилева, ул.К.Сатпаева, 2 , Нур-Султан 010000, Казахстан

Тел: +7(717)2709451

Факс: +7(717) 2928775

E-mail: ribers@mail.ru



