

ФМБА РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Федеральный научно-клинический центр

физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

(ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)

119435, Москва, ул. Малая Пироговская, д.1А Тел. (499) 246-77-21 Факс (499) 246-44-09

<http://www.niifhm.ru>, e-mail: info@niifhm.ru

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

Академик РАН

В.М.Говорун

21.01.2020

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Маланхановой Туяны Баировны «СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность темы исследования

Болезнь (хорея) Гентингтона - тяжелое наследственное нейродегенеративное заболевание, оно вызывается экспансией кодона CAG в гене HTT(гентингтин), что ведет к появлению аномально длинного участка полиглутамина в белке. Ген гентингтин кодирует 350 кДа белок гентингтин с до конца не известным набором функций. В гене дикого типа у разных людей может быть разное количество CAG повторов, однако, когда число повторов превышает 36, развивается болезнь Гентингтона. Для большинства нейродегенеративных заболеваний эффективные методы терапии пока еще не разработаны.

Это связано, в том числе, и с ограниченностью доступа исследователей к нервным клеткам человека и отсутствием адекватных модельных систем для изучения патогенеза заболеваний и тестирования лекарственных средств. Поиск и разработка новых моделей для таких неизлечимых нейродегенеративных заболеваний человека, как болезнь Гентингтона, является актуальной задачей. Технология генетического репрограммирования позволяет из легко доступных клеток, таких как фибробласты кожи, получать в лабораторных условиях индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, а затем и нейроны, столь необходимые для изучения молекулярных механизмов развития нейродегенеративных заболеваний. Технологии редактирования генома позволяют из мутантных клеток делать нормальные, а из нормальных – мутантные, таким образом, позволяя моделировать заболевание на изогенных клеточных системах. Целью работы было создание и характеристика модельной системы болезни Хантингтона (Гентингтона) на основе изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Таким образом, и идеологически, и методически работа очень актуальна.

Научная новизна, достоверность и значимость результатов

Туяной Баировной для выполнения цели диссертации создана эффективная система для внесения удлиненного тракта триплетов CAG (>36) в экзон 1 гена HTT человека на основе донорной плазмиды и плазмиды, экспрессирующей CRISPR/Cas9, и внесен избыточный повтор CAG в нормальный аллель HTT эмбриональных фибробластов человека. Из этих клонов были получены ИПСК и проведена их характеристика с помощью стандартных тестов на плюрипотентность.

Была проведена направленная дифференцировка ИПСК с мутацией в гене HTT и контрольной изогенной линии ИПСК в срединные шипиковые нейроны стриатума, охарактеризован мутантный фенотип полученных нейронов. Хочется отметить, что диссертант разработал оригинальную методику дифференцировке и убедительно доказал, что нейроны, которые получают в результате дифференцировки – именно ГАМК-

эргические. Полученная изогенная модельная система позволит проводить комплексное изучение молекулярно-генетических и клеточных механизмов развития БХ, а также тестирование фармакологических препаратов. Кроме того, научные результаты, стратегии и подходы, использованные в данной работе, могут быть применены при создании изогенных клеточных моделей целого ряда полиглутаминовых заболеваний человека

Структура и содержание диссертации

Результаты работы представлены в виде диссертации, которая изложена на 118 страницах, включающих в себя 21 рисунок и 3 таблицы. и список литературы из 214 публикаций по теме исследования. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения и выводов.

Обзор литературы написан грамотным русским языком, хорошо структурирован, легко читается и даёт полное представление о проблематике диссертации. Автор планомерно подводит читателя к постановке экспериментальных задач. При прочтении обзора литературы создается впечатление, что автор старается рассказать обо всем, что связано с хореей Гентингтона. В обзоре литературы обсуждается и само заболевание и его патогенез, и функции нормального и мутантного гентингтина, и модели – животные и клеточные. Отдельная глава посвящена моделированию заболевания с помощью ИПСК и изогенные системы, созданные с помощью геномного редактирования. Обзор литературы основан как на классических, так и на современных источниках, он дает исчерпывающее представление о проблемах заболевания, его моделирования и лечения.

Раздел «Материалы и методы» написан достаточно подробно. Ознакомление с этим разделом позволяет воспроизвести все использованные автором методы без привлечения специальной литературы. Очень важным, по моему мнению, является то, что автор особенно подробно описал оригинальные методики, особенно протокол дифференцировки ИПСК в нейроны. В разделе «результаты» Туяна Баировна описывает получение изогенных нормальным линий эмбриональных фибробластов с удлинённым CAG повтором в гене HTT

методом CRISPR/CAS9, получение и характеристику ИПСК из этих фибробластов, а также получение срединных шипиковых нейронов стриатума из этих клеток. Что интересно, на полученной изогенной системе диссертанту удалось подтвердить данные об измененной дифференцировке в ранние нейроэпителиальные предшественники в мутантных ИПСК. Любопытно, почему стриатальные нейроны при этом получаются хорошие, и процент дифференцировки обычно не ниже, чем в контроле.

Также в работе было продемонстрировано, что предшественники срединных шипиковых нейронов с мутацией в НТТ имели значительно более низкую выживаемость при удалении BDNF и низкий уровень N-кадгерина по сравнению с изогенным контролем.

Существенных замечаний по содержанию диссертации нет. В качестве дискуссионных вопросов можно было бы задать следующие – 1. Все-таки, почему нужно было именно эмбриональные фибробласты редактировать? С одной стороны, это быстроделющиеся молодые клетки, они обладают способностью к клональному росту, поэтому выбор удачен. С другой стороны, число пассажей, которые пройдет эта индивидуальная клетка сначала при редактировании, а потом и при репрограммировании, возможно, нивелирует изогенность и вклад генетического фона по сравнению со вкладом множественных пассажей. Интересно было бы сравнить изогенные мутантные линии ИПСК, полученные из фибробластов и из ИПСК, а также их нейральные производные. 2. «Плюрипотентный статус клеток» - не очень удачный термин. Плюрипотентность – это свойство. Более удачным было бы употребление термина «плюрипотентность». Например: «проверка плюрипотентности клеток» или «доказательство, что клетки плюрипотентны».

Имеющиеся замечания - не замечания, а, скорее, вопросы для дискуссии, и они не влияют на общую высокую научную значимость полученных автором результатов и сформулированных выводов. Автором получены новые ценные экспериментальные данные, которые имеют важное прикладное значение и могут быть использованы целым рядом организаций, например, ИБР РАН, ИМБ РАН, ИМГ РАН и др.

Результаты работы опубликованы в ведущих международных и отечественных журналах и доложены на международных конференциях по теме диссертации. Опубликованные статьи и тезисы говорят об авторском вкладе в проведенные исследования, полностью отражают содержание диссертации, а выводы соответствуют полученным данным. Автореферат отражает содержание диссертации и соответствует материалам, изложенным в диссертационной работе. Таким образом, диссертационная работа Маланхановой Туяны Баировны «СОЗДАНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА» является законченной работой, отвечающей требованиям ВАК п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. N 842 с изменениями Постановления правительства РФ от 21.04.2016 г. N 335, в редакции Постановления Правительства РФ от 28.08.2017 г. N 1024, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Отзыв заслушан и одобрен на объединенном семинаре лабораторий клеточной биологии и генной инженерии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России 20 января 2020 года (протокол №1-2020).



21.01.2020

доктор биологических наук, профессор РАН, член-корреспондент РАН,
руководитель лаборатории клеточной биологии,
Лагарькова Мария Андреевна
Тел.: (499) 246-4900; e-mail: lagar@rcpcm.org

Подпись М.А. Лагарьковой заверяю.

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России
К.б.н. Е.С. Кострюкова

