

ОТЗЫВ

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

Работа Маланхановой Т.Б. посвящена разработке клеточной системы, моделирующей болезнь Хантингтона *in vitro* на основе изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Данное заболевание относится к нейродегенеративным, вызывается мультипликацией CAG-триплетов (>36) в первом экзоне гена *HTT* и начинает проявляться в возрасте 30-50 лет. В последнее десятилетие для моделирования генетических болезней *in vitro* активно применяются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК). Использование иПСК обусловлено их изогенностью (генетической идентичностью клеткам пациента), а также отсутствием этических проблем, связанных с их получением. Таким образом, стали возможны генетические манипуляции с мутантными клетками пациентов, а также скрининг и тестирование различных препаратов *in vitro*. В представленной работе автор использует самые современные методы, включающие внесение генных конструкций в геном клеток с помощью системы CRISPR/Cas9, получения иПСК с помощью специфических эписомных векторов, направленная дифференцировка полученных клеток в срединные шипиковые нейроны (СШН) и анализ последних методом электронной микроскопии.

Учитывая, что автором осуществлена работа по созданию *in vitro* модели болезни Хантингтона с использованием иПСК, актуальность диссертации не вызывает сомнений. В ходе выполнения поставленных задач, автор получил фибробласты от «здоровых» пациентов, внёс в полученные клетки мутации, характерные для болезни Хантингтона, перепрограммировал их в иПСК, а затем дифференцировал последние в СШН. Далее автор охарактеризовал полученные СШН и выявил ряд отличий мутантных СШН от контрольных. Несмотря на генетическое соответствие полученных клеток болезни Хантингтона, соискатель отмечает, что характерных для этого заболевания ядерных и цитоплазматических агрегатов белка хантингтина обнаружено не было. Автор объясняет этот факт важностью «возрастных» эпигенетических модификаций, которые исчезают в момент получения иПСК. Тем не менее, у полученных СШН отмечено наличие длинных и тонких шипиков, дефективных синапсов и митохондрий с изменённой морфологией. Также были отмечены нарушения в формировании нейральных розеток мутантными линиями СШН, а также отличный от контроля уровень N-кадгерина. Перечисленные этапы работы, несомненно, являются очень трудоёмкими, а оптимизация отдельных методов может занимать месяцы, а то и годы. Так, например, автором указано, что в момент генетической модификации фибробластов кожи человека было проанализировано 603 клон, среди которых только 23 несли вставки различной длины. Два из них были отобраны для дальнейших манипуляций. Далее, на этапе получения иПСК, были отобраны 34 и 21 линии от двух клонов. Особенно хочется отметить аккуратность работы. Автор ответственно подходит к анализу «off-target» регионов – нецелевых участков, которые потенциально могут пострадать во время применения CRISPR/Cas9. У анализируемых клонов эти последовательности были секвенированы, было подтверждено отсутствие нецелевых мутаций. Кроме того, у полученных клонов на больших выборках

была проверена стабильность кариотипа. В целом, в каждом эксперименте присутствуют все необходимые контроли.

В ходе прочтения автореферата возникло несколько вопросов и замечаний. Отсутствует информация о об известных и предполагаемых функциях белка хантингтина. Не совсем ясно, какова выборка в эксперименте по получению нейральных розеток – были ли это единичный эксперимент, или результат повторяется регулярно? То же самое касается нехарактерной морфологии шипиков. В литературе указывается, что болезнь Хантингтона проявляется в зрелом возрасте, и обусловлена наличием агрегатов хантингтина. Считает ли автор наблюдаемые им в культуре отличия от дикого типа (нейральные розетки, шипики, митохондрии) важными проявлениями болезни или артефактами культивирования? Ведь, как указано автором, для образования агрегатов хантингтина и проявления болезни важен «эпигенетический возраст», который был «обнулен» у полученных СШН в ходе перепрограммирования в ИПСК. В таком случае, как можно объяснить нормальное развитие нервной ткани в онтогенезе, и начало проявления патологий только в зрелом возрасте? Интересно было бы узнать, рассматривал ли автор возможность «состаривания» клеток в культуре с целью получения СШН, соответствующих нервной ткани человека 30-50 лет?

Высказанные замечания ничуть не снижают ценность, полноту и трудоёмкость работы. Использованные методы и упорство позволили автору решить актуальную задачу, сделать адекватные выводы и опубликовать 5 статей в журналах, входящих в перечень ВАК.

Работа является законченным научно-квалификационным исследованием, отличающимся новизной и имеющим практическую ценность. Диссертация Маланхановой Т.Б. соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Врио директора Института Цитологии РАН

Зав. лаб. Молекулярной биологии стволовых клеток,

Д.б.н., чл-корр. РАН А.Н. Томилин

Подпись



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт цитологии Российской академии наук

Тихорецкий проспект 4, Санкт-Петербург 194064, Россия

Телефон: +7 (812) 297-18-29, +7 (812) 297-18-29

Электронная почта: cellbio@incras.ru



10.02.2020
Копия
А.Н. Томилин