

О Т З Ы В

на автореферат диссертации Т.Б. Маланхановой: «Создание и характеристика клеточной модели болезни Хантингтона», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Диссертационная работа Т.Б. Маланхановой посвящена разработке клеточной модели болезни Хантингтона (БХ). БХ является аутосомно-доминантным нейродегенеративным заболеванием, вызываемым генетически обусловленной протеинопатией и приобретением белком хантингтином цитотоксических свойств. Заболевание обусловлено умножением кодона CAG в гене НТТ, кодирующим мутантный белок хантингтин.

Целью работы явилась разработка клеточной модели БХ на основе лабораторно созданных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека изогенных клеточных линий, отличающихся друг от друга наличием или отсутствием патологической мутации. Для этого Т.Б. Маланханова успешно овладела как новейшими экспериментальными методами - генной коррекцией, получением ИПСК, дифференцировкой стволовых клеток, так и рутинными методами молекулярной биологии - генное секвенирование, иммуноферментный анализ, Вестерн-блот, трансфекция.

В проведенной работе для создания ИПСК несущих патологическую мутацию, была произведена коррекция гена путем внесения удлиненного тракта триплетов CAG (>36) в первый экзон гена НТТ культивируемых клеток человека с использованием инструмента для редактирования генов CRISPR/Cas9 и гомологичной рекомбинации с донорным плазмидным вектором. Эффективность гомологичной рекомбинации в локусе НТТ в фибробластах была стандартной для этой процедуры. Синтез мутантного хантингтина в клетках фибробластов был подтвержден с помощью вестерн-блот при использовании антител против полиглутаминового тракта (polyQ) и N-концевого фрагмента хантингтина.

Для получения ИПСК из контрольных и содержащих мутацию НТТ фибробластов были использованы стандартные эписомные векторы, обеспечивающие временную повышенную экспрессию факторов плюрипотентности. Были выделены несколько десятков клонов, несущих мутантный ген НТТ, из них были выбраны 4 клон, демонстрирующие относительно стабильный и близкий к норме кариотип. Отобранные клоны экспрессировали ген НТТ с 69-ю и 53-мя последовательными триплетами CAG (мутантный НТТ). Иммуногистохимически было показано, что используемые линии ИПСК экспрессируют основные маркеры плюрипотентных клеток. Все отобранные 4 линии ИПСК, а также изогенный контроль (ИПСК из исходных фибробластов) были подвергнуты направленной дифференцировке и со временем прекращали делиться. Иммуногистохимически было показано, что дифференцированные клетки экспрессируют маркеры зрелых нейронов и белки специфического фенотипа - ферменты синтеза специфических нейротрансмиттеров, белки везикулярного цикла и рецепторы к дофамину. С помощью электронной микроскопии показано, что эти клетки обладают и признаками патологически измененных нейронов, например, в виде аномальных шипиков и митохондрии.

Разработанная диссертантом изогенная клеточная модель БХ может служить основой для изучения генетических, клеточных и молекулярных механизмов патогенеза БХ. Скрининг потенциальных лекарств на данной модели *in vitro*, хотя и возможен, может носить предварительный характер, так как при использовании этой модели не учитывается эпигенетическое влияние окружающих тканей мозга, а также степень проницаемости гемато-энцефалического барьера для исследуемых веществ. Все материалы работы подробно изложены в автореферате, все эксперименты проведены с необходимыми контролями и адекватно иллюстрированы. Результаты работы

представлены в пяти публикациях, три из которых вышли в зарубежных журналах. К оформлению автореферата замечаний нет.

Следует, однако, отметить, что созданная клеточная модель БХ требует важной доработки – воспроизведения патологических изменений белка хантинтина. В этом случае ее значение для скрининга лекарственных средств резко возрастет. Кроме того, автор работы использует неудачный термин «срединные шипиковые нейроны», что, вероятно, является результатом не слишком удачного перевода с английского языка. Вероятно, имеются в виду «внутренние шипиковые нейроны», т.е. те нейроны, тела которых находятся в стриатуме. И наконец, значение полученных результатов выглядело бы более выигрышно, если бы автор в начале раздела «Актуальность исследования» уделил бы больше внимания фенотипическим изменениям нейронов стриатума при БХ, а также их клиническим проявлениям.

Таким образом, из ознакомления с авторефератом следует, что диссертационная работа Маланхановой Т.Б. является оригинальным законченным научно-квалификационным исследованием, имеющим не только большую научную, но и практическую ценность. Работа отвечает требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Заведующий Лабораторией
Нервных и нейроэндокринных регуляций
Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН,
академик РАН



М.В. Угрюмов

28.01.2020



Проверено
и
подписано
М.В. Угрюмов
Заведующий
отдела кадров
Тютин О.А.
28.01.2020