

Отзыв

на автореферат диссертации Устьянцевой Елизаветы Ивановны «Создание и функциональный анализ клеточной модели бокового амиотрофического склероза с помощью генетически-кодируемых биосенсоров», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Диссертационное исследование Устьянцевой Е.И. посвящено созданию и характеристике клеточной модели бокового амиотрофического склероза (БАС) на основе изогенных линий индуцируемых плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), несущих встройку генетически-кодируемых биосенсоров перекиси водорода. Автор детально рассматривает молекулярные механизмы развития БАС, а также подходы к получению клеточных моделей, которые способны воспроизводить особенности заболевания. В работе описан процесс создания клеточной модели БАС на основе культур ИПСК человека, которая способна воспроизводить картину патологических процессов, ассоциированных с заболеванием. Модельные клетки были получены путем внесения однонуклеотидных замен в позиции с.272A>C и с.382G>C гена SOD1 ИПСК здорового донора K7-4, которые приводят к замене аспарагина на аланин в 90 позиции (D90A) и глицина на аргинин в 127 позиции (G127R) белка SOD1. Кроме этого, автором были получены ИПСК пациента, страдающего наследственной формой БАС, несущего гомозиготную замену в позиции с.272A>C гена SOD1. В дальнейшем клетки подверглись устойчивой модификации с помощью генетических конструкций, предназначенных для доксициклин-управляемой экспрессии белков-биосенсоров перекиси водорода в цитоплазме (Cyto-roGFP2-Orp1) и митохондриях (Mito-roGFP2-Orp1). Генетический материал был встроен в локус AAVS1 ИПСК здорового донора, пациент-специфичных ИПСК и ИПСК с внесенными заменами.

Экспериментальная клеточная модель БАС была разработана при помощи направленной дифференцировки ИПСК здорового донора, пациент-специфичных ИПСК и ИПСК с внесенными заменами в моторные нейроны. В ходе экспериментов были получены трансгенные клеточные линии, со встроенными в геном конструкциями, кодирующими доксициклин-управляемую систему экспрессии (Tet-On) биосенсоров перекиси водорода. Для обеспечения встройки последовательностей, кодирующих биосенсоры и регуляторные элементы в специфический «safe harbor»-локус AAVS1, была выбрана технология CRISPR/Cas9. Такое технологическое решение представляется оптимальным, поскольку встройки в AAVS1 не

оказывают негативного влияния на функционирование клетки и, следовательно, не влияют на результаты исследований.

Актуальность диссертационной работы обусловлена отсутствием релевантных *in vitro* моделей БАС. Такие модели необходимы для поиска способов терапии этого тяжелого заболевания и тестирования инновационных лекарственных препаратов. Описанные автором подходы к использованию новейших инструментов редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 для эффективного и специфичного внесения модификации в геном клеток имеют исключительную ценность для дальнейшего развития направления научно-исследовательской деятельности в области создания клеточных моделей заболеваний. Данное диссертационное исследование имеет высокую практическую значимость, поскольку развитие методов редактирования генома и технологии биосенсоров могут ускорить создание модельных систем для разработки тестирования инновационных лекарственных препаратов. Поскольку возможность получения первичного биоматериала от пациентов, страдающих редкими заболеваниями, существенно ограничена, использование технологий получения ИПСК, в том числе изогенных линий, полученных путем редактирования генома, является наиболее рациональным решением для преодоления этих ограничений.

Научная новизна работы состоит в получении и дальнейшей апробации релевантной и чувствительной *in vitro* модели БАС на основе генетически модифицированных ИПСК человека, несущих гены белков-биосенсоров перекиси водорода. На основе ИПСК здорового донора, пациент-специфичных ИПСК и ИПСК с внесенными заменами впервые был получен ряд трансгенных линий, несущих встройку генетических конструкций, предназначенных для доксициклин-управляемой экспрессии (Tet-On) биосенсоров перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях. Автором убедительно доказано, что разные мутации в гене *SOD1* проявляются по-разному на уровне моторных нейронов, полученных из ИПСК, с более выраженным патологическим действием с.382G>C.

Диссертация Устьянцевой Е.И. имеет четкую и логичную структуру и состоит из введения, четырех глав, выводов и списка литературы. Работа изложена на 150 страницах, содержит 29 рисунков и 4 таблицы. Автореферат полностью отражает содержание диссертационного исследования.

Работа является законченным научно-квалификационным исследованием, отличающимся новизной и имеющим значительную практическую ценность. Диссертация Устьянцевой Е.И. по своей актуальности и объему проведенных исследований полностью

соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Гершович Павел Михайлович, к.б.н.

Директор департамента разработки генотерапевтических препаратов, ЗАО «БИОКАД»

198515, Россия, г. Санкт-Петербург, п. Стрельна, ул. Связи, д. 34, лит. А.

+7 (812) 380 49 33, доб. 8598

gershovich@biocad.ru

