

«УТВЕРЖДАЮ»



Врио генерального директора
ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России
Лагарькова М.А.

2021 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического Агентства» на диссертационную работу Устьянцевой Елизаветы Ивановны «Создание и функциональный анализ клеточной модели бокового амиотрофического склероза с помощью генетически-кодируемых биосенсеров», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Актуальность исследования

Диссертационная работа Устьянцевой Елизаветы Ивановны посвящена созданию и изучению клеточной модели бокового амиотрофического склероза (БАС) – нейродегенеративного заболевания, при котором происходит прогрессирующая дегенерация центральных и периферических моторных нейронов. Стратегия лечения таких пациентов состоит из двух частей: паллиативная помощь, призванная обеспечить удовлетворительный уровень качества жизни; и модифицирующая терапия, цель которой – замедлить скорость прогрессии симптомов БАС. С одной стороны, качество паллиативной поддержки больных с БАС значительно улучшилось за последние годы, с другой – лекарственная модифицирующая терапия почти не изменилась за 25 лет. Хотя более 90% случаев имеют спорадический характер (сБАС), позволяя предполагать наличие вирусных факторов или факторов внешней среды, влияющих на развитие заболевания, оставшиеся 10% имеют доказано генетическую природу. Поиск патологических особенностей нейродегенеративных заболеваний, потенциальных мишеней для их терапии является колоссально сложной задачей, требующей разработки адекватных клеточных моделей, наиболее полно воспроизводящих генетические особенности патологического процесса. Несмотря на большую неоднородность БАС с клинической и этиологической точки зрения, на клеточном уровне, все сводится к ограниченному кругу патологических процессов, которые приводят к гибели нейрона: нарушение гомеостаза белков и метаболизма РНК; дефекты функционирования митохондрий, динамики цитоскелета и аксонального транспорта; глутаматная эксайтотоксичность и окислительный стресс. Для изучения данных нарушений наиболее перспективны клеточные модели, которые способны воспроизводить особенности заболеваний и при этом удобны для массового скрининга потенциальных мишеней для лекарственного воздействия. Поскольку, при БАС специфически страдают моторные нейроны, для исследования особенностей заболевания необходимо иметь стабильный источник этих клеток. Неограниченное время жизни плюрипотентных стволовых клеток в культуре, вместе с возможностью направленной дифференцировки в любой желаемый тип клеток, позволяют сегодня разрабатывать интересные модельные системы, в том числе клеточные модели наследственных заболеваний. Сочетание методов репрограммирования и направленной дифференцировки предоставляет уникальную возможность для создания и тестирования новых

терапевтических средств. Исследование культур нейронов, получаемых путем направленной дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с известными генетическими мутациями, позволит оценить взаимосвязь между дегенеративными изменениями и характером клинического синдрома. ИПСК, полученные от пациентов, несут в себе все генетические особенности пациента. Однако сравнение данных, полученных на клетках разных пациентов, затруднено из-за разного генетического фона, который может вносить свой вклад в развитие патологического процесса, маскируя эффект изучаемой мутации. Возможное решение данной проблемы – создание изогенных клеточных линий с помощью методов редактирования генома. Такой подход не только позволяет создавать адекватные пары «случай-контроль», но и исследовать индивидуальный вклад разных мутаций в развитие заболевания, что особенно актуально для БАС с его генетическим разнообразием.

При использовании клеточных моделей необходимо подобрать адекватный способ детекции изменений в клетке, вызванных изучаемой мутацией. Генетически кодируемые биосенсоры представляют собой известный инструмент для изучения биологических процессов. Они позволяют в режиме реального времени регистрировать молекулы-мессенджеры, метаболиты и активность ферментов в живых системах различной сложности: от культивируемых клеток до трансгенных животных. На основе флуоресцентных белков регулярно создаются генетически-кодируемые биосенсоры, позволяющие исследовать протекание различных клеточных реакций в живых системах.

Научная новизна работы и практическая ценность результатов

В представленной работе были получены изогенные линии ИПСК, содержащие однонуклеотидные замены с.272A>C и с.382G>C в гене SOD1 хотя бы в одном аллеле. Две линии с мутациями и исходная здоровая линия ИПСК представляют собой единую модельную систему, которая может быть использована для изучения вклада данных мутаций в развитие БАС. Показано, что данные мутации в гене SOD1 проявляются по-разному на уровне моторных нейронов, полученных из ИПСК, причем замена с.382G>C обладает более выраженным патологическим действием.

Кроме того, на основе здоровых ИПСК, пациент-специфичных ИПСК и ИПСК с внесенными заменами впервые был получен ряд трансгенных линий, несущих встройку генетических конструкций, предназначенных для доксициклину управляемой экспрессии (Tet-On) биосенсоров перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях. Все элементы данных конструкций: последовательности биосенсоров, компоненты системы Tet-On и другие, встроены при помощи CRISPR/Cas9 в специфический «safe harbor»-локус AAVS1. Встройки в AAVS1 не оказывают негативного влияния на функционирование клетки и, следовательно, не влияют на результаты исследований. Сенсоры, несмотря на наличие только одной копии в геноме, продуцируют сигнал, который адекватно отражает изменения в уровне перекиси водорода в цитоплазме и митохондриях.

Структура диссертационной работы

Диссертационная работа Устьянцевой Е.И. изложена на 150 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список использованных сокращений, список цитируемой литературы и приложения. Диссертация содержит 29 рисунков и 4 таблицы.

Характеристика диссертации

Во **Введении** обоснована актуальность темы диссертации, ее практическая значимость и новизна, сформулированы цель и задачи исследования, приведены положения, выносимые на защиту.

Глава 1 «Обзор литературы» состоит из пяти основных частей, некоторые из которых разделены на подпункты. Приведены сведения о симптомах БАС и существующих в настоящее время методов терапии данного заболевания. Подробно рассмотрены недостатки существующих методов лечения. Описаны применяемые в лабораторной практике модели БАС, обсуждаются их достоинства и недостатки. Освещены современные данные о патогенезе БАС и изменениях, вызываемых заболеванием, на клеточном уровне. Описано генетическое репрограммирование соматических клеток до плюрипотентного состояния и история развития данного метода. Описан общепринятый подход к использованию клеточных моделей на основе ИПСК пациентов для изучения наследственных заболеваний. Рассказано о создании изогенных клеточных линий с помощью технологии CRISPR/Cas9, освещены преимущества изогенных клеточных моделей перед набором ИПСК с разным генетическим фоном от пациентов и здоровых доноров. Также автор подробно рассматривает различные типы генетически-кодируемых биосенсоров, приводит примеры применения таких сенсоров в клеточных моделях для изучения широкого спектра биологических процессов

Глава 2 «Материалы и методы» содержит описание методов, использованных в исследовании. В диссертационном исследовании были использованы разнообразные методы клеточной и молекулярной биологии, биохимии, геномного редактирования. Описаны методы получения и характеристики ИПСК, методы оценки окислительного стресса в различных клеточных компартментах с использованием рациометрических биосенсоров Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1. Материал изложен достаточно четко и дает представление об использованных подходах. Использованные автором методы современны, адекватны поставленным задачам и демонстрируют высокий методический уровень автора.

Глава 3 «Результаты» содержит пять разделов и описывает результаты проведенного диссертантом исследования. Получение пациент-специфических ИПСК от пациентов с БАС и их характеристика описаны ясно и детально. Выполнено внесение однонуклеотидных замен в ген SOD1 с помощью системы CRISPR/Cas9 с использованием рекомбинантного Cas9. Подробно описано получение трансгенных линий ИПСК, содержащих встройки биосенсоров перекиси водорода Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 в локусе AAVS1. Проведена направленная дифференцировка ИПСК в спинальные моторные нейроны. В полученной клеточной популяции подтверждена экспрессия генов-маркеров зрелых моторных нейронов (HB9, ISL1, ChAT). Автором предложен новый способ культивирования зрелых нейронов, при котором клетки растут не на поверхности, покрытой матриксом, а заключены в слой матрикса. Такой способ позволяет культивировать нейроны более длительное время без спонтанного открепления при смене среды. Автор показал, что индуцибельная экспрессия биосенсора сохраняется лишь в случае регулярного добавления доксициклина в ходе дифференцировки и созревания моторных нейронов. Однако, добавление доксициклина к уже зрелым нейронам слабо активирует экспрессию биосенсора. Автор подтвердил функциональность биосенсоров перекиси водорода Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 в полученных клеточных линиях. С помощью данных сенсоров было оценено влияние перекиси водорода и глутамат-индуцированной эксайтотоксичности на зрелые мотонейроны.

В **главе 4 «Обсуждение»** автор обсуждает правомерность использованных им подходов к моделированию и изучению БАС. Описаны преимущества и недостатки биосенсоров перекиси водорода Cyto-roGFP2-Orp1 и Mito-roGFP2-Orp1 и особенности их работы в модельной культуре зрелых моторных нейронов. Рассмотрено влияние мутаций с.272A>C и с.382G>C в гене SOD1 на способность моторных нейронов утилизировать экзогенную перекись водорода и переносить глутаматную эксайтотоксичность. Автор приходит к выводу, что для гибели моторных нейронов линии SOD1-G127R нарушение баланса окислительно-восстановительных реакций в митохондриях является первичным и

именно митохондриальная дисфункция лежит в основе наблюдаемых явлений, что согласуется с данными литературы.

В **Заключении** изложены полученные автором результаты и подчеркнута их значимость в контексте современного состояния проблемы.

Выводы хорошо аргументированы и соответствуют поставленным задачам.

Однако к диссертационной работе имеются следующие **замечания**:

1. В тексте диссертации присутствуют технические ошибки: несколько опечаток и на рисунке 18 отсутствуют микрофотографии моторных нейронов на 20, 22 и 29 дни дифференцировки, хотя они заявлены в подписи к рисунку.
2. В работе встречаются необычные для научной литературы или косноязычные речевые обороты, например: «загадочный патологический процесс», «болезнетворная мутация», «разделяют общий генетический фон друг с другом и здоровой линией ИПСК».
3. Поскольку клонирование очень травматичный для плюрипотентных клеток процесс, высок риск отбора аномальных клонов, которые приобрели повышенный пролиферативный потенциал в результате хромосомных aberrаций. Общепринятой является практика кариотипирования клонов ИПСК после каждого субклонирования, а не только при получении линии, как в представленной работе.
4. Клоны ИПСК, полученные от одного пациента, могут отличаться друг от друга по морфологическим и физиологическим параметрам, в том числе и по способности отвечать на окислительный стресс и эксайтотоксичность. Для исключения этого эффекта было бы уместно включить в исследование еще 1-2 клон пациента-специфических ИПСК.

Поскольку в работе продемонстрированы новые интересные данные о патогенезе БАС, хотелось бы задать диссертанту ряд **вопросов**:

1. Приводят ли мутации в гене *SOD1*, затрагивающие те же домены белка, что и в настоящей работе, к аналогичным изменениям в функционировании митохондрий и антиоксидантных систем клетки? Насколько клеточный фенотип БАС однороден при различных мутациях *SOD1*? Возможна ли разработка одного потенциального лекарственного средства для всех пациентов с мутациями в *SOD1*?
2. Возможно ли, что столь драматические изменения в функционировании митохондрий, наблюдаемые в линиях с мутациями в *SOD1*, отчасти были усугублены воздействием доксициклина на митохондрии? Влияние производных тетрациклина на митохондриальный потенциал было показано (Song H, et al., (2014) Cytotoxic Effects of Tetracycline Analogues (Doxycycline, Minocycline and COL-3) in Acute Myeloid Leukemia HL-60 Cells. PLoS ONE 9(12): e114457. doi:10.1371/journal.pone.0114457), возможно страдает и антиоксидантная система митохондрий.
3. Планируется ли подтвердить полученные данные на изогенной системе, состоящей из клеток пациента с мутацией в гене *SOD1* и клеток с исправленной мутацией?
4. Насколько применение РНП снижает вероятность офф-таргет эффектов при использовании CRISPR/Cas9?

В целом диссертационная работа Устьянцевой Е.И. выполнена на высоком научном и методическом уровне, и предъявляемые замечания никак не умаляют научной значимости проделанной работы.

Заключение

Содержание работы полностью отражено в 5 работах, опубликованных в журналах, соответствующих Перечню ВАК России для опубликования основных научных результатов диссертации.

Достоверность полученных автором результатов и сделанных на их основе выводов не оставляет сомнений. Положение автора в составе авторского коллектива в опубликованных работах свидетельствует о личном вкладе диссертанта в выполненное исследование.

Автореферат диссертации полностью отражает основное содержание диссертации. Таким образом, диссертация Устьянцевой Елизаветы Ивановны «Создание и функциональный анализ клеточной модели бокового амиотрофического склероза с помощью генетически-кодируемых биосенсоров» является законченной оригинальной работой, научное и практическое значение которой в области генетики, клеточной биологии и цитологии не вызывает сомнений. По своему содержанию, уровню выполнения научных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов диссертация полностью отвечает требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Устьянцева Елизавета Ивановна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология (биологические науки).

Отзыв составлен 20 августа 2021 года н.с. Лаборатории клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, к.б.н. (специальность 03.02.07 – генетика) Лебедевой Ольгой Сергеевной.

Отзыв на диссертационную работу Устьянцевой Е.И. «Создание и функциональный анализ клеточной модели бокового амиотрофического склероза с помощью генетически-кодируемых биосенсоров» рассмотрен, обсужден и одобрен единогласно на заседании отдела клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России 25 августа 2021 года, протокол № 8.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России), 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская дом 1а, Телефон: +7 (499) 246-91-65, E-mail: gribova@rcpcm.org (Грибова Т.Н.), oslebedeva@niifhm.ru (Лебедева О.С.). <http://rcpcm.org/>

н.с. Лаборатории клеточной биологии

ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, к.б.н.

(специальность 03.02.07 – генетика)

Лебедева Ольга Сергеевна.

Подпись Лебедевой О.С. заверяю:

ученый секретарь

ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России,

к.б.н.



Грибова Татьяна Николаевна