

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Живень Марии Константиновны «Модуляция экспрессии гена HIF2A в плюрипотентных стволовых клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – «генетика»

Актуальность темы диссертации

Факторы, индуцируемые гипоксией (HIFs) - консервативные белки, регулирующие клеточный ответ на гипоксическое воздействие у млекопитающих. HIFs запускают разнообразные транскрипционные каскады, которые в свою очередь, играют важную роль в управлении механизмами гликолиза, ангиогенеза, эритропоэза, поддержания сосудистого тонуса и клеточной выживаемости. Модуляция уровня экспрессии HIFs может быть эффективным терапевтическим воздействием. Так, при онкологических заболеваниях снижения уровня HIFs в раковых клетках, по-видимому приведёт к противоопухолевому эффекту. При ишемических заболеваниях напротив, уместным будет повышения уровня продукции HIFs в клетках, что будет запускать процессы *de novo* ангиогенеза.

Таким образом, представляется очевидной актуальность работы Марии Константиновны, посвящённой исследованию инструментов модуляции экспрессии HIF2A в плюрипотентных стволовых клетках человека.

Новизна проведённых исследований и полученных результатов

Мария Константиновна пошла оригинальным путем — она воздействует на уровень продукции белка HIF2A не прямо, а снижая дозу его ингибитора EIF3E. За счет этого достигается повышение экспрессии HIF2A естественным образом, без интеграции в геном конструкций, кодирующих HIF2A под контролем конститутивного промотора. Этот подход представляется более уместным, так как позволяет моделировать биологически достоверное повышение экспрессии белка HIF2A. Кроме того, Мария Константиновна изучает ангиогенный

потенциал эндотелиальных производных ЭСК человека, стабильно экспрессирующих HIF2A.

Все эти работы были проведены впервые и обладают значимой научной новизной.

Степень обоснованности и достоверности научных положений, выводов, рекомендаций и заключений.

Для решения исследовательских задач Мария Константиновна задействовала современные методы клеточной и молекулярной биологии, а также планировала эксперименты опираясь на уже опубликованные в этой области данные. Особенно приятно, что экспрессия целевых генов была изучена Марией Константиновной при помощи различных методов, в том числе для оценки количества мРНК была использована цифровая капельная ПЦР, а для исследования количества белка применялся Вестерн-блот анализ. Характеризуя полученные генетически-модифицированные клетки Мария Константиновна использует не только секвенирование и стандартные тесты, но и проводит кариотипирование полученных субклонов, что свидетельствует о серьёзном подходе к созданию модельных линий.

Использование автором разнообразных и хорошо валидированных экспериментальных подходов позволяет уверенно утверждать, что полученные Марией Константиновной данные достоверны, а сделанные выводы обоснованы.

Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики

Клеточный ответ на гипоксию включает в себя скоординированную работу десятков белков и запуск разнообразных транскрипционных каскадов. Несмотря на значительный прогресс в этой области, полного понимания всех процессов, происходящих в клетке при переходе от нормоксии к гипоксии нет. В связи с этим представляется очевидной значимость результатов работы Марии Константиновны, создавшей удобную модель для изучения механизмов HIF-зависимого ангиогенеза. Помимо использования в фундаментальных

исследованиях подобная модель может быть применима и в прикладных трансляционных работах, как инструмент отработки средств индукции ангиогенеза в повреждённых тканях.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Полученные Марией Константиновной результаты могут быть использованы для дальнейшего изучения процессов HIF-зависимого ангиогенеза, кроме того полученные её линии, стабильно экспрессирующие HIF2A могут быть использованы как модельные для создания систем поиска ингибиторов HIF-опосредованных каскадов.

Оценивая содержание диссертации в целом, в первую очередь нужно отметить хорошо структурированное изложение материала. Диссертация построена по классической схеме, во введении Мария Константиновна формулирует научную проблему и ставит задачи, которые необходимо решить. Состоящий из девяти подглав обзор литературы позволяет читателю погрузиться в проблему и понять выбор методологии исследования. Раздел «материалы и методы» содержит детальное описание всех экспериментальных процедур, уровень изложения позволяет воспроизвести эксперименты. Раздел «результаты» содержит подробное изложение полученных результатов. Мария Константиновна описывает получение генетически-модифицированных ЭСК человека с делецией участка гена *EIF3E*. В полученных субклонах Мария Константиновна выявила снижение уровня как мРНК, так и белка EIF3E. Мария Константиновна обратила внимание, что наличие стабильного белка HIF2A в субклоне E12 вызывает повышение экспрессии генов гликолитического пути (PDHX, PDK1) и митохондриального окисления (MT-ND1, MT-CO1). По результатам функциональных тестов, Мария Константиновна показывает, что в субклонах H9 и E12 с делецией *EIF3E*, демонстрирующих повышенную экспрессию HIF2A, наблюдается также и повышенная эффективность направленной мезодермальной

дифференцировки. Особенно интересно, что генетически-модифицированные эндотелиальные производные обладают повышенным ангиогенным потенциалом *in vitro* по сравнению с дифференцированными эндотелиальными производными исходных линий. Это подтверждается на молекулярном уровне в виде повышенной экспрессии проангиогенных факторов: ANG1, bFGF, VEGFR2, CXCR4 для субклонов H9 и E12, VEGF – для субклона H9.

Обращает на себя внимание хорошо написанный раздел обсуждения, где полученные Марией Константиновной данные тщательно обсуждаются в сравнении с ранее опубликованными.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с общепринятыми требованиями, соответствует её содержанию и даёт полное представление об основных положениях работы.

В качестве некоторого замечания хочу отметить специфический стиль изложения: в тексте диссертации изредка встречаются усложнённые смысловые конструкции, которые замедляют понимание представленного материала. Указанный недостаток, однако, не снижает ценности и значимости работы.

Заключение

Считаю, что диссертация Живень Марии Константиновны «Модуляция экспрессии гена HIF2A в плюрипотентных стволовых клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9» полностью соответствует профилю научной специальности 1.5.7. – «генетика».

Диссертация Живень Марии Константиновны «Модуляция экспрессии гена HIF2A в плюрипотентных стволовых клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является продуманной и законченной научно-квалификационной работой. По новизне, научной и практической ценности полученных результатов диссертация полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции

«Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции постановлений Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335, от 02 августа 2016 г. № 748, от 29 мая 2017 г. № 650, от 28 августа 2017 г. № 1024, от 01 октября 2018 г. № 1168 и от 20 марта 2021 г. №426), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, а её автор – Живень Мария Константиновна - заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. – «генетика».

Официальный оппонент:

старший научный сотрудник
лаборатории иммуногенетики
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт молекулярной и клеточной биологии
Сибирского отделения Российской академии
наук (ИМКБ СО РАН),
кандидат биологических наук



Кулемзин Сергей Викторович

630090

город Новосибирск

проспект Академика Лаврентьева д. 8/2

тел: +7383-363-90-72, e-mail: skulemzin@mcb.nsc.ru

