ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Живень Марии Константиновны «Модуляция экспрессии гена HIF-2α 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

Диссертация Марии Константиновны Живень посвящена изучению возможностей управления активностью транскрипционного фактора HIF2A за счет подавления экспрессии его эндогенного ингибитора - EIF3E – в эмбриональных стволовых клетках человека (ЭСК). Исследование активности гипоксия-индуцибельных факторов (HIFs) в клетках млекопитающих в норме и при патологии – большая глава в современной клеточной биологии, генетике, патофизиологии. Известно, что под контролем этих транскрипционных факторов находятся многие процессы, обеспечивающие выживание клеток в условиях гипоксии (гликолиз, митохондриальное дыхание, ангиогенез, эритропоэз и др.), HIF-опосредованные механизмы существенно нарушены при ряде патологических состояний (сердечная недостаточность, опухолевая прогрессия, нейродегенерация, воспаление) и могут быть мишенью для патогенетической коррекции.

Вместе с тем, очевидно, что новые технологические возможности, в частности, протоколы геномного редактирования, открывают перспективы адресной активации или инактивации тех или иных регуляторных молекул в клетках в физиологических и патологических условиях. С другой стороны, эти же технологии, будучи примененными в плюрипотентных клетках, становятся удобным инструментом для получения дифференцированных клеток с «заданными» и контролируемыми свойствами, актуальными для выполнения ими своих специфических функций. Принимая во внимание тот факт, что стволовые и прогениторные клетки, как правило, находятся в гипоксических

условиях, что необходимо для поддержания их популяции, предотвращения рекрутинга и спонтанной дифференцировки (Z. Ivanovic et al., 2009), следует признать, что управление активностью HIFs является интересным и оправданным подходом к направленной регуляции процессов клеточной пролиферации и дифференцировки.

В этом контексте особый интерес представляет развитие клеток эндотелия, которые в дальнейшем участвуют в процессах ангиогенеза, демонстрируя метаболическое перепрограммирование, основанное на изменении баланса продукции энергии: интенсивный гликолиз необходим для активации и дифференцировки tip-клеток (в обычных условиях они имеют низкий уровень гликолиза), а сочетание интенсивного гликолиза и окислительного фосфорилирования - для пролиферации stalk-клеток и неоангиогенеза. Именно HIF2A вовлечен в регуляцию процессов ангиогенеза, васкулогенеза, ветвления и ремоделирования сосудов (T. Hashimoto et al., 2015), а в центральной нервной системе дополнительно участвует в поддержании структурно-функциональной целостности гематоэнцефалического барьера (D. Rand et al., 2021), поэтому потребность в разработке новых протоколов управления метаболической активностью клеток путем изменения активности этого транскрипционного фактора чрезвычайно высока. Ранее попытки управления активностью HIF2A через подавление экспрессии EIF3E (Eukaryotic Initiation Factor 3 Subunit E) осуществлялись путем использования siRNA (например, Q.Li et al., 2018), но не метода геномного редактирования по протоколу CRISSPR-Cas9.

С этой точки зрения, диссертационная работа М.К. Живень, несомненно, актуальна и своевременна: автором поставлена цель получения генетически модифицированных ЭСК человека с повышенной экспрессией HIF2A и их дифференцированных эндотелиальных производных, а достижение этой цели открывает новые технологические возможности в решении актуальных задач биологии, медицины и биоинженерии.

Новизна проведенных исследований и полученных результатов

При выполнении диссертационного исследования М.К. Живень использовала современные методологические подходы, которые включают в себя следующие протоколы: поддержание культуры ЭСК in vitro, в том числе в гипоксических и псевдогипоксических условиях, фенотипирование, дифференцировка ЭСК в мезодермальном и эндотелиальном направлениях, фенотипирование и оценка функциональной компетентности полученных эндотелиальных клеток, протокол нокаутирования EIF3E за счет активности CRISPR/Cas9 для удаления промоторной области и участка первого экзона соответствующего гена с захватом точки начала транскрипции, включая все этапе подготовки и реализации этого протокола, сортинг клеток и скрининг субклонов. Для выполнения этих протоколов были использованы методы клеточной биологии, визуализации клеток, проточной цитометрии, иммуноцитохимии, иммуноблоттинга, секвенирования, ПЦР-анализа (следует отметить, что автором использованы несколько вариантов ПЦР-анализа, что определялось задачами эксперимента), а также методы статистической обработки полученных данных.

Благодаря сочетанию указанных экспериментальных подходов автором получены результаты, обладающие несомненной научной новизной. В частности, получены субклоны клеток с инактивированной экспрессией EIF3E, причем в субклонах H9 линии HuES9 и E12 линии ESM04 зарегистрировано повышение экспрессии HIF2A, а культивирование ЭСК в псевдогипоксических условиях способствовало повышению уровня экспрессии HIF2A и HIF1A в клетках. Установлено, что уровень экспрессии некоторых ферментов гликолиза повышается при культивировании клеток в условиях гипоксии, а также в субклонах E12, H9 и H8. Интересной находкой автора является то, что в этих субклонах повышается уровень экспрессии некоторых митохондриальных ферментов (цитохром с-оксидаза, НАДН-убихинооксидоредуктаза), что свидетельствует об успешном совмещении

двух процессов генерации АТФ – гликолиза и окислительного фосфорилирования в генетически модифицированных ЭСК с повышенной экспрессией HIFs. Убедительно показано, что высокая экспрессия HIF2A, опосредованная подавлением экспрессии EIF3E, способствует повышению эффективности мезодермальной и эндотелиальной дифференцировки ЭСК человека по сравнению с эндотелиальными производными исходных линий, причем фенотипически клетки, полученные из субклонов ЭСК с подавленной экспрессией EIF3E, соответствуют зрелым клетках эндотелия. Установлено, что в таких клетках в условиях гипоксии закономерно увеличивается экспрессия широкого спектра генов, кодирующих белки с проангиогенной активностью (например, ANG1, bFGF, VEGF, VEGFR2, CXCR4, SDF1), что подтверждается высокой интенсивностью процесса ангиогенеза in vitro с участием этих клеток: общая длина сосудистых структур в клетках, полученных из генетически модифицированных ЭСК более, чем в три раза превышала таковую в клетках эндотелия, полученных из контрольных линий ЭСК.

Таким образом, автором впервые получены 3 жизнеспособные генетически модифицированные линии ЭСК человека, моделирующие в нормоксических условиях состояние длительной гипоксии с повышенной экспрессией HIF2A, что обусловлено присутствием делеции участка гена EIF3E, включающей участок промоторной области и начало первого экзона, тогда как во втором аллеле присутствуют микроделеции, включающие участок промоторного региона и не вызывающие сдвига рамки считывания. В рамках работы успешно подтверждена научная гипотеза о том, что метод геномного редактирования, примененный для подавления экспрессии ингибитора HIF2A в ЭСК, является хорошим инструментом для получения клеток, дифференцировка которых в зрелые, функционально компетентные эндотелиоциты является эффективной.

В целом, Марией Константиновной Живень успешно реализован оригинальный подход к решению задачи получения ЭСК с высокой

экспрессией генов плюрипотентности и потенциалом к дифференцировке по мезодермальному и эндотелиальному путям, а также задачи получения клеточных линий с *a priori* высокой активностью HIF2A и проангиогенным потенциалом. Это дает право сделать вывод о том, что диссертация М.К. Живень обладает несомненной научной новизной.

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

Обоснованность основных положений, выводов и практических рекомендаций, сформулированных в работе, обусловлена следующими аспектами: 1) логично выстроенный дизайн работы, сочетающий в себе несколько взаимодополняющих методов исследования и базирующийся на четко сформулированной научной гипотезе; 2) рациональное применение заявленного нового подхода к управлению экспрессией целевого гена в клетках; 3) применение нескольких технологий регистрации функциональной активности, жизнеспособности и экспрессионного профиля клеток, получаемых в результате применения метода геномного редактирования; 4) обсуждение полученных результатов с привлечением большого спектра имеющихся в литературе данных по проблематике работы; 5) использование валидированных протоколов культивирования и модификации клеток; 6) использование набора методов статистической обработки данных.

Считаю, что все положения, выносимые на защиту, выводы опираются на полученные результаты. Цель работы достигнута, задачи решены в полном объеме. Достоверность представленных данных не вызывает сомнений.

Значимость результатов, полученных в диссертации, для науки и практики

Значимость результатов диссертации М.К. Живень для фундаментальной науки (генетика, биоинженерия, клеточная биология,

физиология) определяется тем, что в работе: 1) подтверждена гипотеза о возможности регуляции экспрессии HIFs за счет генетических манипуляций с экспрессией регулятора активности этих транскрипционных факторов в эмбриональных стволовых клетках человека; 2) получены данные о характеристиках субклонов, демонстрирующие их фенотипические характеристики, пригодные для использования в экспериментальных, посвященных изучению механизмов адаптации к гипоксии, метаболического перепрограммирования, развития тканей, неоангиогенеза; 3) идентифицированы новые эффекты «псевдогипоксии» в отношении клеток с разным уровнем экспрессии HIFs; 4) определены возможности использования разработанного протокола генетической модификации клеток для решения задач биоинженерии с использованием клеток эндотелия, например, при моделировании гистогематических барьеров in vitro.

Значимость результатов диссертации для практической деятельности (регенеративная медицина, нейрогенетика, онкология, хирургия) определяется тем, что они: 1) создают научную основу для развития методов реконструктивной и регенеративной медицины; 2) могут быть эффективно использованы при разработке новых протоколов подавления или стимуляции ангиогенеза.

С учетом этих аспектов, диссертация М.К. Живень имеет высокую теоретическую и практическую значимость.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты диссертационной работы М.К. Живень могут быть рекомендованы к использованию в следующих областях: 1) генетика, клеточная биология, эмбриология – при планировании и выполнении работ по изучению механизмов развития клеток и тканей, механизмов поддержания популяции стволовых и прогениторных клеток в клоногенных нишах,

применению методов геномного редактирования, обеспечению направленной дифференцировки клеток, разработке протоколов активации/инактивации экспрессии целевых генов и их белковых продуктов; 2) физиология, биохимия – при изучении эффектов гипоксии на метаболический статус и функционирование клеток, в том числе в контексте феномена метаболической адаптации к гипоксии, реализации эффекта Варбурга, 3) биоинженерия и регенеративная медицина – при создании новых in vitro моделей сосудов, разработке клинических протоколов восстановления сосудов in vivo; 4) высшее профессиональное образование в области биологии, генетики и медицины. Все указанные направления могут быть реализованы в университетах, клинических и академических центрах Российской Федерации.

Оценивая содержание диссертации в целом, должна отметить, что диссертация написана хорошим академическим языком, логично построена, читается легко и с интересом, достаточно хорошо иллюстрирована. Работа изложена на 127 страницах машинописного текста, имеет классическую структуру, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы с 12 подглавами с описанием результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы.

Введение к диссертации систематизирует актуальность, цель, задачи, положения, выносимые на защиту, личный вклад автора, степень достоверности и апробации полученных результатов, теоретическую и практическую значимость выполненного исследования. Обзор литературы обобщает современные представления об особенностях экспрессии HIFs в норме и при гипоксии, о регуляции активности механизмов, сопряженных с экспрессией HIFs, о роли этих транскрипционных факторов в регуляции плюрипотентности, ангиогенеза, устойчивости к гипоксии, а также данные об опыте применения активаторов и ингибиторов HIF-ассоциированной сигнальной трансдукции в клинической практике. Автором акцентируются новые возможности в целевой регуляции экспрессии HIFs за счет применения

современных технологий геномного редактирования, в том числе с использованием стволовых клеток. Глава «Материалы и методы» содержит подробное изложение всех протоколов, реализованных в рамках исследования, этот материал детализирован и обладает несомненной внутренней логикой в изложении. Глава «Результаты» полно излагает полученные результаты, и логично перетекает в главу «Обсуждение», чтение которой убеждает в том, что автор свободно ориентируется в тематике исследования, владеет аналитическим взглядом на исследуемую проблему, не боится обсуждать полученные данные с разных точек зрения, четко представляет себе возможные области применения результатов работы, в том числе их дальнейшего развития для решения актуальных задач медицины. Это свидетельствует о том, что М.К. Живень является сложившимся исследователем, способным нетривиально решать поставленные задачи междисциплинарного характера.

Все полученные результаты полно представлены в научных профильных изданиях, а также на конференциях российского и международного уровней. Автореферат диссертации оформлен в соответствии с общепринятыми требованиями, соответствует ее содержанию и дает полное представление об основных положениях работы. Принципиальных замечаний по автореферату нет.

При чтении работы возникли следующие замечания: 1) в тексте встречаются отдельные опечатки; 2) в работе присутствуют неудачные стилистические обороты, например, «физиологическая гипоксия»; 3) в диссертации отсутствует раздел «Практические рекомендации», несмотря на то, что они точно могли быть сформулированы, исходя из полученных результатов; 4) подписи по оси X на некоторых рисунках плохо читабельны (слишком громоздки и затрудняют восприятие информации); 5) в работе отсутствуют резюмирующие схемы или рисунки (в главе «Обсуждение»), которые бы были уместны для акцентирования особенностей экспрессионного

профиля и функциональной активности клеток с измененным уровнем экспрессии EIF3E и HIF2A; 6) формулировка вывода 4 неудачна: процессы гликолиза и окислительного фосфорилирования совмещены в большинстве клеток, и это точно не является прерогативой описываемых субклонов.

Вместе с тем, все указанные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общее положительное впечатление от работы.

Предлагаю автору следующие **вопросы в формате научной дискуссии** по проблематике исследования:

1) Известно, что пируватдегидрогеназа (PDH) регулирует «переключение» процессов генерации АТФ: высокая активность этого фермента свидетельствует о реализации механизмах окислительного фософрилирования, а вызванное фосфорилирование снижение активности PDH имеет своим результатом активизацию гликолитической утилизации пирувата. Как в этом контексте Вы объясняете результаты, свидетельствующие о повышении экспрессии PDH в субклонах, демонстрирующих и высокую гликолитическую активность, и митохондриальное дыхание?

2) Функциональная компетентность клеток эндотелия определяется не только их участием в процессах ангиогенеза, но и способностью выполнять барьерные функции в сосудистой стенке. Оценивалась ли Вами экспрессия каких-либо транспортных молекул или белков межклеточных контактов для характеристики эндотелиальных клеток, полученных из ЭСК с подавленной экспрессией EIF3E?

3) Почему, по мнению автора, субклоны H9 и E12 демонстрируют разные эффекты в отношении изменения синтеза мРНК HIF2A и соответствующего белка?

4) Насколько, по мнению автора, аналогичный методический подход может быть востребован при получении клеток эндотелия со специальными свойствами, например, клеток эндотелия церебральных микрососудов,

обладающих высокоселективной проницаемостью и большим количеством митохондрий?

Заключение

Считаю, что диссертация Живень Марии Константиновны «Модуляция экспрессии гена HIF-2α в плюрипотентных стволовых клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9» полностью соответствует паспорту научной специальности 1.5.7 - «генетика»: п. 7 («реализация генетической информации (транскрипция, трансляция), механизмы регуляции экспрессии генов, роль геномных перестроек в реализации генного действия»), п. 10 («генетическая и клеточная инженерия»), п. 13 («генетика соматических клеток»), п. 17 («генетика человека, медицинская генетика, генотерапия»).

Диссертация Живень Марии Константиновны «Модуляция экспрессии гена HIF-2α в плюрипотентных стволовых клетках человека с использованием системы CRISPR/Cas9», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, содержащей решение важной научной задачи генетики – применение метода геномного редактирования для получения клеток с заданными свойствами и управления механизмами клеточной дифференцировки, вносящей таким образом значительный вклад в развитие представлений механизмах регуляции экспрессии генов в норме и при патологии. По новизне, научной и практической ценности полученных результатов, перспективам их практического применения диссертация полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых 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 и от 01 октября 2018 г. № 1168 с изменениями от 26 мая 2020 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук,

а ее автор – Живень Мария Константиновна - заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – «генетика».

Официальный оппонент:

Главный научный сотрудник и заведующий
Лабораторией экспериментальной нейроцитологии
Отдела исследований мозга
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Научный центр неврологии»,
доктор медицинских наук
(14.03.03 – патологическая физиология),
профессор Алла Борисовна Салмина

Россия, 125367, г. Москва,
Волоколамское шоссе, д.80,
Тел. +7(495)9170999; E-mail: allasalmina@mail.ru

Подпись доктора медицинских наук, профессора Салминой А.Б. удостоверяю:

Учёный секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии», старший научный сотрудник, кандидат медицинских наук Анна Николаевна Евдокименко

«09» сентября 2021 г.

Вх 2171/85
15.09.2021