

УТВЕРЖДАЮ:

Временно исполняющий обязанности
директора Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Института общей
генетики им. Н.И. Вавилова
Российской академии наук
д.б.н. А.М. Кудрявцев



« 9 » июня 2016 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Диссертация "Создание модельной системы для изучения функции генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием технологии генетического репрограммирования" выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук и в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной генетики Российской академии наук.

В период подготовки диссертации с 2009 по 2012 гг. Лебедева Ольга Сергеевна обучалась в очной аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук, после окончания обучения и до настоящего времени работает в должности младшего научного сотрудника в том же учреждении (с 2015 г. как совместитель). С 2015 года работает также в должности младшего научного сотрудника в Федеральном государственном бюджетном учреждении

Федеральном научно-клиническом центре физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства.

В 2009 году Лебедева О.С. с отличием окончила Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по специальности «Биохимия».

Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов выдано в 2015 году Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Институтом молекулярной генетики Российской академии наук.

Научные руководители – д.б.н., проф. РАН Лагарькова Мария Андреевна, заведующий лабораторией генетики развития в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук и д.б.н., проф. Гривенников Игорь Анатольевич заведующий лабораторией молекулярной генетики соматической клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук.

По итогам рассмотрения диссертации "Создание модельной системы для изучения функции генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием технологии генетического репрограммирования" принято следующее **заключение:**

Актуальность исследования

Наследственные нейродегенеративные заболевания представляют собой одну из наиболее актуальных проблем современной неврологии и нейробиологии. Для ряда нейродегенеративных заболеваний созданы трансгенные модели, разрабатываются подходы к генной терапии болезней. Однако, более детальное изучение закономерностей нейродегенерации требует разработки адекватных клеточных моделей, наиболее полно воспроизводящих генетические особенности патологического процесса. Изучение функций генов, а также разработка методов их доставки в клетки позволили разработать технологию генетического репрограммирования - изменения специализации соматической клетки.

Например, используя набор генов, кодирующих транскрипционные факторы, поддерживающие плюрипотентное состояние, можно репрограммировать любую клетку взрослого организма, индуцировать в ней плюрипотентность. 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. Не случайно именно за работы по репрограммированию соматических клеток Дж. Гердону и Ш. Яманака была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине за 2012 г. Исследование культур нейронов, получаемых путем направленной дифференцировки из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) с известными генетическими мутациями, а также от носителей спорадических форм болезни, позволит оценить взаимосвязь между дегенеративными изменениями и характером клинического синдрома.

Болезнь Паркинсона (БП) является прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием. БП развивается в результате гибели дофаминергических нейронов черной субстанции. Медикаментозные методы лечения могут лишь замедлить развитие заболевания, но не излечить его. БП может быть вызвана как факторами внешней среды, так и наследственными факторами. Известно пять генов, мутации в которых вызывают БП.

Работа с материалом пациентов ограничена только постмортальными образцами мозга. Осуществлять скрининг и проверку новых лекарственных препаратов на животных возможно, но этот способ имеет ограничения, так как некоторые вещества метаболизируются организмом животного по путям, отличным от человеческого организма. Лабораторные животные не страдают многими нейродегенеративными заболеваниями, в том числе и БП. В этом случае поражение специфического типа нервных клеток индуцируется введением

химических веществ или повышенной экспрессией мутантного гена, с которым связывают развитие болезни. Модель, основанная на таком нефизиологическом пути индукции БП у лабораторного животного, не всегда может адекватно воспроизводить симптомы заболевания и, таким образом, затруднять изучение патогенеза болезни.

Решением данной проблемы может быть создание модели заболевания на основе ИПСК, несущих мутации, связанные с развитием БП, из материала пациентов с установленным диагнозом. ИПСК являются практически бесконечным источником клеточного материала и могут быть дифференцированы в любой тип клеток взрослого организма, в том числе в нейрональные предшественники и дофаминергические нейроны. Разработка такой модели БП позволит изучать функции продуктов мутантных генов в клетке и механизмы развития заболевания. Дифференцированные производные ИПСК могут быть также использованы для скрининга новых лекарственных препаратов.

Научная новизна и практическая значимость исследования

В ходе работы впервые в России были получены линии ИПСК, несущие мутации в генах PARK2 и PARK8, интеграционным и неинтеграционным методами. С помощью анализа метилирования ДНК линий ИПСК, полученных из материала одного донора интеграционным и неинтеграционным методами, впервые было показано достоверное отсутствие различий между линиями. Эти данные свидетельствуют о том, что способ получения ИПСК не влияет на их свойства на уровне метилирования ДНК.

Разработанный в ходе диссертационного исследования протокол нейрональной дифференцировки ИПСК позволяет получать культуру зрелых нейронов, на 80% состоящую из тирозингидроксилаза - положительных клеток, что соответствует уровню мировых достижений в данной области.

При транскриптомном анализе полученных нейрональных культур были показаны различия между клетками пациентов и здорового донора в уровне экспрессии генов, участвующих в таких процессах, как синтез нейромедиаторов,

функционирование фагосом и лизосом, деление клетки и клеточный цикл, функционирование митохондрий, гликолиз.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Работа выполнена на высоком методическом уровне с применением самых современных методов молекулярной генетики и клеточной биологии. Результаты, полученные Лебедевой О.С., достоверны и воспроизводимы.

Соответствие диссертационной работы избранной специальности

Диссертационная работа соискателя Лебедевой О.С. соответствует избранной специальности 03.02.07 – генетика (согласно п.п. 6, 11, 17 Паспорта номенклатуры специальностей научных работников по данной специальности).

Личный вклад автора в исследование

Основные результаты были получены лично автором, либо при его участии в планировании и проведении экспериментов. Получение и характеристика ИПСК выполнены совместно с Лагарьковой М.А., Богомазовой А.Н., Некрасовым Е.Д., Юрьевой К.С., Честковым И.В., Сурдиной А.В., Сюсиной М., Новосадовой Е.В. Эксперименты по проточной цитофлуориметрии выполнены совместно с Васиной Е.М. Обсчет данных полногеномного метиломного анализа выполнялся Шутовой М.В., наращивание клеток и выделение ДНК выполнено автором. Обсчет данных полногеномного транскриптомного анализа выполнен совместно с Васиной Е.М., дифференцировка и наращивание клеток, а также выделение мРНК проводились лично автором.

Полнота изложения материалов диссертации в печатных работах

Основные положения и результаты диссертационного исследования изложены автором в 12 печатных работах, в том числе в 7 статьях по теме диссертационной работы в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК Минобрнауки для опубликования основных научных результатов диссертации, в 5 публикациях в других изданиях, в 9 тезисах, представленных на российских и международных

конференциях. В опубликованных работах полностью изложен материал диссертации.

Диссертация Лебедевой Ольги Сергеевны на тему "Создание модельной системы для изучения функции генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием технологии генетического репрограммирования" является научно-квалификационной работой, в которой описана модельная система для поиска лекарств от болезни Паркинсона на основе дифференцированных из ИПСК человека постмитотических дофаминергических нейронов, также продемонстрировано применение этой модельной системы для изучения изменения паттерна экспрессии генов в мутантных нейронах по сравнению с немутантными. Работа Лебедевой О.С. соответствует критериям, которым должна отвечать диссертация, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 «Генетика».

Диссертация "Создание модельной системы для изучения функции генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием технологии генетического репрограммирования" Лебедевой Ольги Сергеевны рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Заключение принято на межлабораторном семинаре Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН. Присутствовало на заседании 13 чел. Результаты голосования: «за» - 13 чел., «против» - 0 чел., «воздержалось» - 0 чел., протокол от 9 июня 2016 г.

Руководитель семинара,
зав. лаб. ИОГен РАН, д.б.н., проф.



Муха Д.В.