

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию

ЛЕБЕДЕВОЙ ОЛЬГИ СЕРГЕЕВНЫ

«Создание модельной системы для изучения функции генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием технологии генетического репрограммирования»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика

Актуальность проблемы

Исследование Лебедевой О.С. посвящено индуцированным плюрипотентным клеткам (ИПСК) – одной из самых актуальных проблем современной биологии. С момента получения ИПСК изучение механизмов поддержания плюрипотентности, дифференцировки и связанной с нею дифференциальной экспрессии генов, регуляции развития остаются в центре внимания. После того, как были получены ИПСК и доказана возможность прямого репрограммирования генома соматической клетки, исследования механизмов регуляции экспрессии генов получили совершенно новые возможности и перспективы. Несомненно, одним из магистральных направлений стала разработка пациент-специфических клеточных систем с использованием ИПСК от пациентов, страдающих наследственными заболеваниями. Эти системы дают возможность изучать широкий спектр вопросов, включающих молекулярные механизмы развития заболевания, характеристики клеток поврежденных тканей, генетический скрининг, поиск способов медикаментозной и генетической коррекции и многое другое. Не упускается из внимания и возможная перспектива клеточной терапии таких пациентов. Работа Лебедевой О.С. посвящена актуальным вопросам репрограммирования генома соматической клетки до плюрипотентного состояния у пациентов с врожденной формой болезни Паркинсона, а именно, разработке методов репрограммирования, разработке оптимальных протоколов

дифференцировки ИПСК в нейральном направлении для получения тирозингидроксилаза-положительных постмитотических нейронов, а также исследованию вопроса о влиянии мутаций на процесс репрограммирования и дифференцировки. С полным основанием можно сказать, что работа О.С. Лебедевой находится на передовом крае развития современной науки.

Общая характеристика работы

Основной текст работы состоит, помимо Введения, из Главы 1, представляющей собой «Обзор литературы», Главы 2 «Материалы и методы», Главы 3 «Результаты и их обсуждение», включающей 6 разделов, «Заключения», «Выводов», «Списка литературы» и десяти Приложений. Работа изложена на 106 страницах основного текста, не считая списка литературы (218 источников), вспомогательных материалов и Приложений. Общий объем работы 158 страниц.

В **Главе 1** приведены результаты литературного анализа состояния изучаемой проблемы. Обзор литературы производит великолепное впечатление – он написан очень грамотно, подробно, логично и свидетельствует о хорошей теоретической подготовке соискателя. Автор содержательно рассматривает все основные вопросы, относящиеся к работе: репрограммирование и методы, применяемые для его осуществления, характеристика ИПСК, в том числе их эпигенетика, способы дифференцировки в нейрональном направлении, патогенез болезни Паркинсона на клеточном и молекулярном уровне, а также модели болезни Паркинсона на основе ИПСК.

В **Главе 2** «Материал и методы» автор описывает методы, использованные ею в работе. Следует отметить широкий арсенал этих методов, их самый современный уровень и высокую трудоемкость. Лебедева О.С. использовала разнообразные приемы культивирования клеток, трансфекции и сопряженных с нею процедур, иммуногистохимию, полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией, проточную цитометрию, кариотипирование, транскриптомный анализ, анализ метилирования ДНК. Выбранные автором методы адекватно

решают поставленные задачи и грамотно описаны, статистическая обработка проведена корректно.

Основные **Главы 3.1-3.6** содержат описание результатов работы. В целом, следует отметить большой объем проведенной работы. Приведены результаты репрограммирования до плюрипотентного состояния фибробластов кожи человека здоровых доноров и пациентов, несущих мутации в генах PARK8 и PARK2. При этом использовано два метода: интеграционный (лентивирусная трансдукция) и неинтеграционный (инфекция вирусом Сендай). Проведены необходимые исследования для идентификации клеток как ИПСК: морфологическая оценка, анализ экспрессии генов плюрипотентности (с проверкой замолкания трансгенов) с помощью ПЦР и иммуногистохимии, функциональный тест на плюрипотентность (формирование эмбрионидных телец с последующей дифференцировкой в клетки трех зародышевых листков). Кариотипирование продемонстрировало нормальный кариотип полученных линий. Продемонстрирована принципиальная возможность получения ИПСК от пациентов с болезнью Паркинсона и отсутствие явных различий между полученными линиями и клетками от здоровых доноров. Исследования метилирования генома продемонстрировали схожесть паттерна метилирования в независимости от метода репрограммирования и еще раз показали значение индивидуальных особенностей линий ИПСК. Изложение работы по совершенствованию протокола дифференцировки ИПСК в тризингидроксилаза-положительные нейроны сопровождается проверкой эффективности этой дифференцировки в нормальных ИПСК и ИПСК, полученных от доноров с болезнью Паркинсона. Автор констатирует отсутствие различий в нейронах, полученных разработанным способом, независимо от наличия мутаций. В данном случае, я бы согласилась с автором по поводу того, что отсутствие таких различий в данной работе не означает их отсутствие как таковое, поскольку речь может идти и о сроках наблюдения, и о функциональных особенностях, не выявленных в работе. В дальнейшем, несомненно, стоит обратить пристальное внимание на реакцию полученных нейронов на

разнообразные воздействия, их выживаемость, устойчивость к стрессорным факторам и многое другое. Все сделанные диссертантом выводы соответствуют поставленным целям и объективно отражают результаты исследования. По материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 7 статьи в журналах, включенных в перечень научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК. Автореферат и публикации в полной мере отражают содержание диссертации.

Научная новизна

В работе Лебедевой О.С. впервые продемонстрировано, что осуществление репрограммирование интеграционным или неинтеграционным методом не вызывает существенных различий между полученными линиями ИПСК на уровне метилирования генома. Впервые в России получены и заложены на хранение линии ИПСК от пациентов несущих мутации в генах, ассоциированных с болезнью Паркинсона. Транскриптомный анализ дифференцированных нейронов показал специфические для мутантных генов различия в процессах синтеза нейромедиаторов и деление клеток. Особый интерес, на мой взгляд, представляют данные о различиях в функционировании митохондрий и системы кислого эндосомального компартмента.

Практическая значимость

В результате выполнения диссертационной работы Лебедевой О.С. удалось разработать надежный протокол для дифференцировки ИПСК в тирозингидроксилаза-положительные постмитотические нейроны, что явилось предметом патентной заявки. При этом доказано, что полученные пациент-специфические нейроны в культуре несут исходный мутантный фенотип. Обоснована возможность эффективного получения ИПСК неинтеграционным методом, что может быть в будущем использовано в целях применения клеточной терапии у пациентов. В целом, разработан вариант модельной системы болезни Паркинсона *in vitro*.

Принципиальных замечаний к работе нет. Конечно, автору не удалось избежать мелких шероховатостей, таких как описание материала в Приложении

3, где оба донора названы здоровыми или подписи к Рисунку 2 в автореферате, где некоторые сокращения не расшифрованы (сказался процесс сокращения текста для автореферата), но в целом работа тщательно оформлена и не имеет существенных недочетов.

Заключение

Таким образом, диссертационная работа «Создание модельной системы для изучения функции генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием технологии генетического репрограммирования» соответствует основным квалификационным критериям (пункт 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор, Лебедева Ольга Сергеевна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

И.о. зав. лаб. клеточной биологии
Института биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН,
доктор биологических наук

Екатерина Андреевна Воротеяк

14.11.2016

Адрес организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26
Тел.: +7 (499) 135-33-22
Факс: +7 (499) 135-80-12
E-mail: idbras@bk.ru

Подпись Е.А. Воротеяк заверяю:
Ученый секретарь
Института биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН,
кандидат биологических наук



М.Ю. Хабарова