

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу 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.

Диссертационная работа Лебедевой О.С. посвящена исследованию болезни Паркинсона с использованием модели на основе нейрональных культур, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных клеток человека. Изучение механизмов нейродегенерации требует разработки клеточных моделей, наиболее полно воспроизводящих генетические особенности патологического процесса. Создание таких клеточных моделей стало возможным в последнее время благодаря технологиям генетического репрограммирования - изменения специализации соматической клетки. Сочетание методов репрограммирования и направленной дифференцировки клеток предоставляет уникальную возможность для изучения этиопатогенеза наследственных заболеваний, создания и тестирования новых средств их лечения. В этой связи актуальность и практическая значимость работы Лебедевой О.С. определяются тем фактом, что 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, а сами такие культуры представляют собой уникальную модель для тестирования различных соединений на нейропротекторную активность и использоваться для мониторинга нейродегенеративных изменений на фоне терапевтических вмешательств.

Исследования молекулярно-генетических и клеточных механизмов репрограммирования и дифференцировки клеток человека имеют большое значение как для фундаментальной науки, так и для развития клеточной терапии. В рамках диссертационной работы Лебедевой О.С. разработан эффективный и воспроизводимый протокол нейрональной дифференцировки ИПСК, позволяющий получать культуру постмитотических нейронов, более чем на 80% состоящую из тирозингидроксилаза - положительных клеток. Авторская методика дифференцировки и ее модификации являются предметом патентной заявки. Используя разработанный протокол, автор впервые в России создала линии ИПСК пациентов с болезнью Паркинсона, несущие мутации в генах *PARK2* и *PARK8*.

Важной частью работы явилось изучение влияния интеграционного и неинтеграционного метода репрограммирования фибробластов человека на метилирование ДНК на полногеномном уровне, показавшее отсутствие достоверных различий между способами доставки репрограммирующих факторов в фибробласты кожи человека. Возможность получения ИПСК неинтеграционным методом в

будущем может быть использована в целях клеточной терапии различных заболеваний человека.

Диссертационная работа Лебедевой О.С. изложена на 158 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список цитируемой литературы и приложения. Диссертация содержит 24 рисунка и 15 таблиц. Библиографический указатель содержит 218 источников.

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

Глава «Обзор литературы» состоит из двух основных частей, которые разделены на подпункты. Первая часть обзора посвящена индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам и аспектам репрограммирования. Приводятся понятие и методы репрограммирования (интеграционные и неинтеграционные). Отдельное внимание уделено изменениям метилирования ДНК в процессе репрограммирования. Рассмотрены особенности направленной дифференцировки ИПСК в нейроны. Вторая часть обзора посвящена болезни Паркинсона: даётся краткая историческая справка, общая клиническая характеристика, описан патогенез болезни Паркинсона (БП) на клеточном уровне. Подробно описаны наследственные факторы заболевания.

Глава «Материалы и методы» имеет строгую логическую структуру. В отдельных разделах главы перечислены и описаны реагенты и расходные материалы, протоколы экспериментов. Приведено 19 протоколов, что подчёркивает всесторонний подход автора диссертационного исследования, в частности, к тщательной и подробной характеристике получаемых репрограммированных клеток.

Глава «Результаты и их обсуждение» содержит шесть разделов и описывает результаты проведенного диссертантом исследования. Обсуждение результатов проводится с акцентом на эффекты интеграционного и неинтеграционного методов репрограммирования.

В первом разделе главы «Результаты и их обсуждение» соискатель описывает получение, характеристику и сравнительный анализ эффективности репрограммирования фибробластов кожи человека интеграционным и неинтеграционным методами. Описана выборка пациентов, послуживших донорами клеток, процессы получения ИПСК с помощью лентивирусной трансдукции и неинтеграционным методом с помощью инфекции вирусом Сендай, охарактеризованы эффективность репрограммирования, особенности морфологии и кариотипа клеток, экспрессии генов в процессе репрограммирования. Для функционального подтверждения плюрипотентного статуса клонов ИПСК, полученных из фибробластов кожи человека, был использован тест на формирование клетками эмбрионидных телец, а также анализ их последующей дифференцировки в клетки, принадлежащие трем зародышевым листкам. Все полученные клоны ИПСК были охарактеризованы согласно общепринятым стандартам. Все линии имели

нормальный кариотип; линии, полученные от пациентов с БП, содержали в своем геноме соответствующие мутации. Все линии ИПСК экспрессировали основные маркеры плюрипотентного состояния на уровне, сопоставимом с ЭСК человека (по данным ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией, и иммуноцитохимического анализа). Все линии ИПСК продемонстрировали способность к образованию эмбрионных тел и последующей дифференцировке в производные трех зародышевых листков. Таким образом, плюрипотентность полученных в ходе исследования линий ИПСК была подтверждена на молекулярном и функциональном уровнях. В заключение сделан вывод, что по сравниваемым параметрам интеграционные и неинтеграционные ИПСК не отличаются друг от друга.

Второй раздел «Результатов и их обсуждения» посвящен изучению влияния интеграционного и неинтеграционного методов репрограммирования на метилирование ДНК в ИПСК человека. По паттернам метилирования ДНК наименьшая корреляция была обнаружена между нейронами и их исходными линиями ИПСК. Причем корреляция внутри каждого типа клеток значительно выше, несмотря на то, что в анализе присутствовал материал от двух доноров. Эти данные свидетельствуют о том, что различия в паттернах метилирования плюрипотентных клеток и их дифференцированных производных являются более глобальными, чем индивидуальные различия доноров клеточного материала и линий ИПСК. Кроме того, по результатам исследования соискатель делает вывод о том, что метод репрограммирования не влияет на паттерн метилирования ДНК ИПСК, имеющих один генетический фон.

В третьем разделе главы приводится сравнительное исследование условий культивирования фибробластов и ИПСК, полученных от здорового донора и пациентов с БП. Приводятся результаты морфологических и молекулярно-генетических исследований. Отмечается, что потенциал к дифференцировке не зависит от способа получения ИПСК, а также на него не оказывают влияния мутации в генах *PARK8* и *PARK2*. В обсуждении указано, что другие авторы, исследующие наследственные формы БП на моделях, основанных на ИПСК, также показали, что мутации в генах *PARK8* и *PARK2* не влияли на процесс репрограммирования и свойства мутантных ИПСК.

Четвёртый раздел посвящен разработке эффективного и воспроизводимого протокола дифференцировки ИПСК в тирозингидроксилаза-положительные нейроны. Разработка собственного протокола обусловлена тем, что использование протокола направленной дифференцировки, опубликованного Kriks S., et al. в 2011 году, не позволило соискателю достигнуть заявленной эффективности дифференцировки в 80% TH-положительных нейронов. В этой части главы подробно описаны авторские модификации, структура и эффективность разработанного протокола.

В пятой части главы «Результаты и их обсуждение» рассматривается эффективность дифференцировки нормальных ИПСК и ИПСК, полученных от доноров с БП. Определение эффективности нейрональной дифференцировки необходимо для использования дифференцированных производных ИПСК в качестве модели для изучения БП. На основании большого количества собственных

экспериментов с использованием разнообразных биомаркеров автор доказывает эффективность своего способа получения клеточной популяции для дальнейших исследований механизмов патогенеза БП.

Шестая часть главы «Результаты и их обсуждение» посвящена характеристике дифференциальной экспрессии генов в нейрональных производных ИПСК, полученных от пациентов с БП и здорового донора. Показано, что наиболее обогащенными дифференциально экспрессированными генами при БП являются метаболические пути, связанные с функционированием митохондрий, фагосом и лизосом. Этот первый эксперимент с применением разработанной модели показывает возможность её использования в исследовании патогенеза заболевания, например, при изучении функционирования митохондрий при развитии БП, а также для скрининга потенциальных лекарственных препаратов.

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

Выводы, сделанные автором, хорошо аргументированы и соответствуют поставленным задачам.

К диссертационной работе имеются следующие замечания:

1. Методы широкогеномных исследований описаны слишком кратко. Даже при условии полного соблюдения способов анализа чипов HT-12v4 Expression BeadChips и Infinium HumanMethylation450, рекомендованных производителями, было бы полезно указать, каковы технические возможности этих чипов с точки зрения покрытия транскриптома (метилома), выявления альтернативных транскриптов, и т.п.
2. Неудачно использован термин «полногеномный» в отношении проведенного исследования метилирования ДНК. Полногеномным сегодня можно считать только анализ метилирования на основе полногеномного секвенирования ДНК с определением статуса всех CpG-динуклеотидов, что, конечно же, не относится к гибридизационной панели Infinium HumanMethylation450 BeadChip, которая предназначена для определения статуса метилирования примерно 480 000 CpG, предвзято выбранных в геноме человека исходя из некоторых априорных гипотез. Более уместным, вместо термина «полногеномный», было бы употреблять в таких случаях «широкогеномный».
3. Вызывает интерес причина выбора метода гибридизационных микрочипов для широкогеномного анализа метилирования ДНК. В цитируемой соискателем работе Meissner «Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells» в качестве такого метода выступает геномное бисульфитное секвенирование. В других работах, на которые ссылается автор диссертации, проводился анализ отдельных целевых фрагментов генома, что нельзя считать строго широкогеномным подходом. Недостатки гибридизационного подхода к геномному анализу метилирования подробно раскрыты в публикациях, посвященных оценке надежности анализа с использованием популярной платформы Infinium HumanMethylation450 BeadChip (HM450). Исследования, проведенные в лаборатории Розанны Вексберг (Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray // Epigenetics. – 2013), показали, что значительное количество зондов в массиве HM450 подвержено кросс-гибридизации с нецелевыми областями генома, либо содержит известные

однонуклеотидные полиморфизмы (SNP). Оба фактора подрывают достоверность анализа метилирования ДНК. Авторы выявили в общей сложности 29 233 зонда, которые имеют высокую вероятность гибридизации в нецелевых областях генома. Кроме того, исследователи обнаружили, что почти половина (49,3%) зондов перекрывает по крайней мере один SNP, причем 13,8% зондов содержат SNP непосредственно в анализируемых CpG-парах (замены в позициях цитозина или гуанина). Авторы пришли к выводу, что участки дифференциального метилирования ДНК, идентифицированные с помощью микрочипов HM450, должны проходить валидацию с использованием независимого метода анализа, например, секвенирования нового поколения.

Другое исследование, проведенное Колумбийским университетом (Batch Effects and Pathway Analysis: Two Potential Perils in Cancer Studies Involving DNA Methylation Array Analysis // Cancer epidemiology, biomarkers & prevention. – 2013), демонстрирует получение при использовании чипов HM450 ложных результатов, связанных с групповым эффектом и использованием общепринятого программного обеспечения. Отмечается также, что при дизайне зондов для HM450 предпочтение отдавалось локусам, представляющим особый интерес с точки зрения ассоциации с распространенными заболеваниями, т.е. эти чипы не являются инструментом непредвзятого скрининга CpG-метилирования генома человека.

Таким образом, опубликованные результаты исследований указывают на необходимость осторожной интерпретации результатов анализа дифференциального метилирования ДНК, полученных с использованием гибридных чипов, в частности, Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip.

4. Даже с учётом неоднозначности решения о выборе гибридной платформы для широкогеномного анализа метилирования ДНК, информационный потенциал полученного массива данных кажется недостаточно использованным в диссертационной работе. Принимается во внимание только общая, интегральная количественная характеристика уровня метилирования по совокупности замеренных точек. В то время, как в разделе «Материалы и методы» указаны критерии поиска различий в индивидуальных сайтах CpG, в описании результатов речи о различиях в индивидуальных сайтах не идёт.

В целом диссертационная работа Лебедевой О.С. выполнена на высоком научном и методическом уровне, представляет собой объемное и разностороннее исследование, выполненное на высочайшем методологическом уровне, и предъявляемые замечания никак не умаляют научной значимости проделанной работы.

Заключение

Содержание работы полностью отражено в 7 статьях, которые опубликованы в журналах, соответствующих Перечню ВАК России для опубликования основных научных результатов диссертации. Автором опубликовано 5 статей в изданиях, не входящих в Перечень ВАК России. Полученные автором данные представлены в виде докладов на 7 международных конференциях.

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. Полученные результаты могут быть использованы исследовательскими учеными, а также медицинскими клиническими учреждениями.

Автореферат диссертации полностью отражает основное содержание диссертации. Таким образом, диссертация Лебедевой Ольги Сергеевны «Создание модельной системы для изучения функции генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, с использованием технологии генетического репрограммирования» является законченной оригинальной работой, научное и практическое значение которой в области генетики и медицины не вызывает сомнений. По своему содержанию, уровню выполнения научных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов диссертация полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям; а ее автор Лебедева Ольга Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика (биологические науки).

Руководитель лаборатории

эпигенетики ФГБНУ «МГНЦ»

д.б.н., доцент по специальности

03.02.07 – генетика

Стрельников Владимир Викторович

«14» ноября 2016 г.

Федеральное государственное научное учреждение «Медико-генетический научный центр» Россия, 115478, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1, телефон 8(499)612-86-07, адрес электронной почты mgnc@med-gen.ru

Подпись Стрельникова В.В. заверяю

Учёный секретарь

ФГБНУ «МГНЦ»,

к.м.н.



Воронина Е.С.