

## ОТЗЫВ

члена диссертационного совета

на диссертацию Перепелиной Ксении Игоревны на тему: «Влияние тканеспецифичных мутаций в гене *LMNA* на процесс дифференцировки клеток», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности

1.5.22. Клеточная биология

### **Актуальность избранной темы**

По современным представлениям, ядерная ламина — фиброзная сеть промежуточных филаментов, подстилающая внутреннюю мембрану ядерной оболочки, — является не просто структурно-механическим «каркасом», определяющим физические (упруго-механические) свойства ядра, но служит связующим звеном между хроматином и цитоплазмой и напрямую вовлечена в процессы структурно-функциональной организации хроматина и регуляции экспрессии генов.

Диссертационная работа К.И. Перепелиной посвящена исследованию мутаций гена *LMNA* человека, который кодирует ламины А/С — ключевые белки ядерной ламины. Особый акцент сделан на эффекте таких мутаций на процессы дифференцировки клеток в зависимости от типа ткани. В актуальности выбранной темы нет никаких сомнений, поскольку мутации в гене *LMNA* являются первопричиной развития ламинопатий — социально значимых тяжелых заболеваний; их молекулярно-генетическая природа установлена, но целостная картина эффектов дисфункций ядерной ламины, вызванных нарушением работы генов, кодирующих белки-ламини, на клетки, ткани и организм пока не сложилась. Наименее хорошо изучена природа ламинопатий, имеющих тканеспецифическое проявление.

Очевидно, что без детальной проработки фундаментальных основ функционирования гена *LMNA* невозможна разработка современных терапевтических подходов в области таргетно-персонифицированной медицины, призванной облегчить страдания и улучшить качество жизни пациентов с ламинопатиями различного генеза.

### **Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы**

Диссертационная работа К.И. Перепелиной в первую очередь имеет фундаментальную направленность. Ее результаты расширяют представления об индивидуальных эффектах измененных белков-ламинонов — продуктов гена *LMNA* при разных его мутациях — на дифференцировку различных клеток мезенхимного происхождения и молекулярных механизмах, лежащих в основе развития ламинопатий,

что представляет несомненную важность в перспективе развития практической биомедицины.

Результаты, полученные в ходе исследования, непременно следует учитывать при чтении курсов лекций по клеточной биологии для студентов и аспирантов университетов, а также включать в учебники и учебные пособия, рекомендуемые учебно-методическими объединениями организаций высшего профессионального образования России.

### **Объем, структура и содержание работы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций**

Работа изложена на 93 страницах машинописного текста, оформлена по традиционному плану и включает следующие разделы: «Введение» (6 с.); «Обзор литературы» (18 с. — 5 подразделов, 9 рис.); «Материалы и методы» (14 с. — 11 подразделов, 3 табл.); «Результаты и обсуждение» (36 с. — 4 подраздела, 25 рис., 1 табл.); «Заключение» (4 с.), в конце которого приведены выводы (их 6 соответственно количеству поставленных задач); список сокращений; список литературы, включающий 169 наименований: 3 на русском языке, 166 — на английском. Страницы 94—177 представляют собой полную англоязычную версию диссертации.

Во Введении диссертант обосновывает актуальность тематики, ее теоретическую/практическую значимость и новизну, формулирует общую цель и 6 конкретных задач, связанных с оценкой влияния мутаций гена *LMNA* на способность различных малодифференцированных клеток дифференцироваться в разных (мио-, адипо- и остеогенном) направлениях; определением возможного места, которое занимают ламины A/C в сигнальном пути Notch; характеристикой электрофизиологических свойств и транскрипционного профиля кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) пациента с тканеспецифичной мутацией гена *LMNA*. Все задачи в ходе выполнения работы диссертантом успешно решены.

В Обзоре литературы обсуждается строение ламин A/C, особенности их посттрансляционного процессинга и функций, включая участие в механотрансдукции, регуляции экспрессии генов и эпигенетическом репрограммировании при дифференцировке клеток. Рассмотрено участие ламин A-типа в качестве регуляторов активности сигнальных молекул при дифференцировке стволовых клеток в разных направлениях с участием сигнальных путей Wnt/ $\beta$ -катенин, Notch, TGF- $\beta$ /Smad и MAPK. В конце раздела приведены общие сведения о различных ламинопатиях —

наследственных заболеваний, связанных с мутациями в генах, кодирующих ламины А/С, и белки, взаимодействующие с ламинами и участвующие в их посттрансляционных модификациях.

Сильное впечатление производит раздел «Материалы и методы», который свидетельствует о высоком профессионализме диссертанта как исследователя-экспериментатора. В работе использовано множество современных методик молекулярной и клеточной биологии. Особое место занимает работа с множеством клеточных линий, в том числе первичных культур кардиальных клеток пациентов и доноров. Описаны способы индукции дифференцировки мезенхимных клеток сердца человека в адипо- и остеогенном направлениях; получение и культивирование iPСК, несущих мутацию R249Q в гене *LMNA*, индукция их дифференцировки в кардиомиоциты. Описано получение генетических конструкций, оценки экспрессии генов с помощью ПЦР, иммуноцитохимические методики, метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp). Представленные протоколы воспроизводимы; раздел не оставляет сомнения в том, что диссертант в совершенстве владеет всеми перечисленными методами.

Главная часть диссертационной работы представлена описанием результатов экспериментов и их обсуждением в свете известных в литературе данных; результаты и обсуждение объединены в одну главу, но это вполне оправдано, следуя логике изложения и последовательности решения поставленных задач. Этот раздел позволяет всесторонне оценить большой масштаб проделанной работы и умение диссертанта анализировать и правильно интерпретировать эмпирические данные.

В экспериментах с использованием миобластов и сателлитных клеток мыши, трансдуцированных лентивирусными частицами, несущими последовательности ламина А человека — дикого типа и с двумя мутациями (G232E и R571S), которые у человека ассоциированы, соответственно, с развитием мышечной дистрофии Эмери-Дрейфуса и дилатационной кардиомиопатии, — установлено, что эти мутации снижают способность клеток к дифференцировке (формированию миотрубок). На мезенхимных клетках сердца человека установлено, что ламин А/С, несущий мутацию R482L, оказывает негативное влияние на сигнальный путь Notch, что приводит к подавлению адипогенной дифференцировки.

Интересные результаты получены при анализе мутации R527C, ассоциированной с нарушением остеогенной дифференцировки. Оказалось, что разные мезенхимные клетки по-разному реагируют на эту мутацию: в мезенхимных клетках сердца она подавляет остеогенную дифференцировку, но активирует ее в

интерстициальных клетках. Иными словами, в одних и тех же условиях эта мутация оказывает тканеспецифическое влияние на дифференцировку в условиях широкого диапазона уровней экспрессии генов-мишеней сигнального пути Notch и остеогенных маркеров в клетках различных типов.

Наконец, на использованной диссертантом клеточной модели ламин-ассоциированной кардиомиопатии показано, что кардиомиоциты, полученные в ходе кардиогенной дифференцировки iPСК от пациента с мутацией R249Q гена *LMNA*, имеют измененные электрофизиологические свойства (функциональную активность Na<sup>+</sup>-каналов) и профиль экспрессии *LMNA* по сравнению с кардиомиоцитами, полученными из iPСК здорового донора.

Полученные результаты подтверждают фундаментальную роль ламина A/C в кардиогенной дифференцировке, регуляции экспрессии маркеров кардиогенеза и вносят существенный вклад в понимание молекулярных основ клеточной дифференцировки и причин, приводящих к развитию ламинопатий различного генеза.

Выводы диссертации (их 6) полностью соответствуют цели и задачам, хорошо аргументированы, подтверждены на большом объеме экспериментального материала и напрямую следуют из полученных результатов и их обсуждения.

Результаты диссертации полностью отражены в 6 статьях, опубликованных в престижных рецензируемых отечественных и международных журналах. Во всех публикациях личный вклад автора является определяющим, в 5 статьях диссертант — первый автор. Материалы диссертации достаточно апробированы на 5 всероссийских и международных конгрессах по клеточной биологии и кардиологии.

### **Критические замечания и вопросы к дискуссии**

Принципиальных возражений и замечаний *по существу* диссертационной работы К.И. Перепелиной у меня нет. Однако не могу не высказать ряд некоторых претензий, в основном касающихся оформления работы.

1. Обзор литературы написан чересчур конспективно и имеет форму краткого реферата, а не аналитического обзора. Из-за этой «конспективности» изложения некоторые фразы выглядят «оборванными». В частности, замечание касается фразы на с. 21: *«Ранее в нашей лаборатории было показано, что различные мутаций LMNA по-разному влияют на паттерн экспрессии генов во время дифференцировки ММСК»* (кстати, в списке сокращений МСК есть, а ММСК нет) — и всё, дальше начинается другая «история». На самом деле для читателя это принципиальный момент — ему необходимо сразу четко понять/представить новизну проведенного исследования, а не

обращаться к работе научного руководителя и соавторов (Malashicheva et al., 2015), на которую ссылается диссертант.

Фраза «*больше примеров... можно найти в ранних обзорах...*» (с. 20) вызывает вопрос: почему количество примеров уменьшается с течением времени? Встречаются другие неудачные словосочетания, вот лишь некоторые из них: «жировой/костный фенотип» (с. 17), «*ДНК ... широко упакована в хромосомы*» (с. 19), «*очень идентичен*» (там же), «*посттранслируемые*» [модификации] вместо «*посттрансляционные*» (с. 12) и др.

Имеются претензии по использованию аббревиатур, не расшифрованных ни в тексте при первом упоминании, ни в списке сокращений. Например, в подписи к рис. 1 не расшифрованы сокращения КЯП и МКТ. Один-единственный раз встретилось сокращение IF (с. 12) — обычно так сокращают иммуофлуоресценцию, и нужно было догадаться, что это промежуточные филаменты. То же — ВКМ, внеклеточный матрикс (с. 16 и далее по тексту): это не общеупотребительное сокращение (для эмбриолога — внутренняя клеточная масса) и т.п.

Наконец, на мой взгляд, весьма нелишней была бы схема, иллюстрирующая строение ламинов A/C, с указанием основных структурно-функциональных доменов, участков, соответствующих последовательностям экзонов гена *LMNA*, и положения исследованных мутаций.

2. Если подавляющее большинство методик (протоколов) в соответствующем разделе описано тщательно, то в отношении получения лентивирусных частиц автор ограничилась лишь следующей ссылкой (авторский стиль сохранен — ДБ.): «*...осуществляли по протоколу, разработанному в лаборатории доктора Д. Троно ... и модифицированный в лаборатории А.Н. Томилина (Malashicheva et al., 2007)*». Следовало кратко этот протокол (с модификациями) воспроизвести, читатель не обязан при общем знакомстве с работой обращаться к первоисточникам.

3. По цитологическим иллюстрациям результатов у меня возник вопрос: что представляет собой «*пузырение*» ядер клеток, несущих мутации *LMNA*? Хотя это слово заключено в кавычки, оно явно неудачное (отсутствует в академических словарях) и, по-видимому, не отражает сути явления, наводя на мысль о блеббинге (отделении «пузырей»), так бывает, например, при формировании особых органелл — микроядер — в ооцитах некоторых беспозвоночных животных, причем в этом процессе тоже важную роль играет ядерная ламина. Насколько я понимаю, в случае патологий, связанных с мутациями гена *LMNA*, речь идет о выпячиваниях/инвагинациях — так? Кроме того, хотелось бы узнать, каков процент клеток с измененной морфологией ядра,

поскольку, судя, например, по рис. 12 и 17, далеко не все клетки имеют измененный фенотип (ср., например, LMNA WT и R482L на рис. 12).

4. Среди прочих можно отметить следующие недочеты. Рис. 29Ж (*проверка кариотипа ИПСК методом молекулярного кариотипирования на чипах*) нечитаемый из-за низкого разрешения и не может быть оценен. Никогда не встречал, чтобы название таблицы располагалось под таблицей, как, впрочем, буква «Ё» для обозначения фрагмента рисунка и употребление слова «обсуждение» во множественном числе в заголовке раздела. Замечание к списку литературы: англоязычная версия журнала «Цитология» называется Cell and Tissue Biology, а не Cytology (это может ввести в заблуждение). В тексте диссертации довольно часто встречаются опечатки, а количество пунктуационных ошибок столь велико, что местами даже затрудняет понимание мысли автора.

Следует, однако, подчеркнуть, что все вопросы и замечания носят исключительно редакционно-технический характер, не затрагивают существа работы, и не умаляют ее научно-теоретической и практической значимости. Считаю, что диссертация К.И. Перепелиной представляет собой целостное, всесторонне обоснованное экспериментальное исследование, обладающее несомненной новизной и тщательно выполненное с применением современных методик. Результаты полностью достоверны, выводы обоснованы.

## **Заключение**

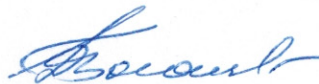
Диссертационная работа Ксении Игоревны Перепелиной является законченным в рамках поставленных задач научно-квалификационным самостоятельным исследованием, выполненным на современном методическом уровне и базирующимся на обширном экспериментальном материале. Она содержит новые обоснованные положения, которые можно трактовать как новое решение актуальной научной задачи в области клеточной биологии и биомедицины, связанной с определением и характеристикой молекулярно-цитологических факторов, служащих причиной ламинопатий и влияющих на дифференцировку клеток — прежде всего тканеспецифичных мутаций гена *LMNA*. Диссертация К.И. Перепелиной, несомненно, открывает перспективы дальнейших исследований структуры и функций клеточного ядра, его немембранных компартментов в контексте нормальной и патологической молекулярной цитофизиологии ядерной ламины.

По актуальности темы исследования, степени обоснованности научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, их достоверности, новизне,

научно-теоретической и практической значимости полученных результатов диссертационная работа Перепелиной Ксении Игоревны на тему: «Влияние тканеспецифичных мутаций в гене *LMNA* на процесс дифференцировки клеток» полностью соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», а соискатель Перепелина Ксения Игоревна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.22. Клеточная биология. Пункты 9 и 11 указанного Порядка диссертантом не нарушены.

Член диссертационного совета:

доктор биологических наук,  
главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН)



Д.С. Боголюбов

Контактные данные:

тел.: +7 (812) 2971829; E-mail: ~~dbogol@mail.ru~~

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:  
1.5.22 – Клеточная биология (шифр и специальность на момент защиты: 03.03.25 – гистология, цитология, клеточная биология).

Адрес места работы:

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4.



Д.С. Боголюбов

18.04.2023

Канцелярия

