

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета Боголюбовой Ирины Олеговны
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

Работа Ксении Игоревны Перепелиной посвящена исследованию влияния точечных мутаций в гене *LMNA* на процессы дифференцировки клеток мезенхимного происхождения. Актуальность работы определяется высокой функциональной значимостью ламинов А/С, кодируемых этим геном, а также их вовлеченностью в патогенез целого ряда наследственных заболеваний, получивших название ламинопатий. Очевидно, что дальнейшая расшифровка механизмов функционирования продуктов гена *LMNA*, в том числе тканеспецифичных, позволит не только расширить наши представления о фундаментальных механизмах дифференцировки и пролиферации, но и заложить основы для разработки таргетной терапии ламинопатий.

Диссертация изложена на 93 страницах машинописного текста и имеет общепринятую для работ подобного рода структуру. На страницах 94—177 представлена полная версия диссертации на английском языке.

В разделе «Введение» (6 с.) автор убедительно обосновывает актуальность и новизну своего исследования, раскрывает его теоретическую и практическую значимость, формулирует цели и задачи работы.

В обзоре литературы (18 с.) автор рассматривает структуру молекулы ламина А/С, процессинг преламина А, функциональное значение посттрансляционных модификаций ламинов, а также ассоциированные с ламинами А/С белки. Отдельное внимание уделяется тканеспецифическим регуляторным функциям ламина А/С, его вовлечению в ключевые сигнальные пути и его роли в процессах клеточной дифференцировки. Помимо этого кратко освещены современные представления об этиологии и патогенезе заболеваний из группы ламинопатий с акцентом на механизмы участия мутантных форм ламина в этих процессах. Обзор литературы написан логично, понятным языком, хорошо иллюстрирован (9 рис.), в том числе оригинальными схемами, и в совокупности со списком литературы, включающим 169 источников (из них 3 на русском, 166 — на английском языке), свидетельствует о глубокой проработке автором литературы, связанной с тематикой исследования.

В разделе «Материалы и методы» (14 с.) приведена вся необходимая информация об использованных в работе клеточных линиях и экспериментальных процедурах. Данный раздел работы наглядно демонстрирует огромный объем экспериментальной работы, проведенной автором, а также очень широкий спектр освоенных им методик, в который входят, в том числе, получение ИПСК, производство лентивирусных частиц и трансфекция клеток, RT-PCR, иммунофлуоресцентное мечение, метод локальной фиксации потенциала и др.

Традиционные разделы «Результаты» и «Обсуждение» в работе объединены вместе (36 с.); полученные результаты автор обсуждает после описания отдельных серий

экспериментов. Такой подход можно считать оправданным, с учетом большого объема экспериментальных данных, в частности большого числа использованных клеточных линий (включая ИПСК человека), он существенно облегчает чтение работы и восприятие полученных автором результатов. В разделе представлены новые данные о влиянии мутаций в гене *LMNA* на процессы миогенной (мутации *LMNA* G232E и *LMNA* R571S), кардиогенной (мутация *LMNA* R249Q), адипогенной (мутация *LMNA* R482L) и остеогенной (мутации *LMNA* R527C и *LMNA* R471C) дифференцировки. Полученные результаты проиллюстрированы 25 рис. и 1 таблицей. Достоверность представленных в данном разделе результатов и их интерпретация не вызывает сомнения; материалы этого раздела убедительно доказывают полноту решения всех поставленных автором задач и достижение цели диссертационного исследования.

В разделе «Заключение» (4 с.) автор подводит общие итоги работы и формулирует выводы, число которых (6) соответствует числу поставленных задач. В совокупности полученные результаты подтверждают значимую роль ламин типа А в процессах клеточной дифференцировки, опосредованную в частности функциональными взаимодействиями ламин А с компонентами сигнального пути Notch.

После прочтения работы хотелось бы задать автору следующие вопросы.

1. Для оценки эффективности трансфицирования сателлитных клеток мышцы проводили иммуноцитохимическую окраску миотрубок с помощью антител, распознающих ламин А/С человека. С чем связано отсутствие перекрестной реакции этих антител с собственными ламинами мышцы?

2. При обсуждении процессов формирования миотрубок автор упоминает два возможных механизма, которые могут быть вовлечены в нарушение процессов миодифференцировки, а именно нарушения пролиферации и слияния. Почему в работе оценивали только индекс слияния, но не оценивали индекс пролиферации? Не может ли формирование укороченных миотрубок, содержащих меньшее количество ядер, быть результатом нарушения пролиферации вследствие мутации гена *LMNA*, ведь, согласно данным литературы, ламин А взаимодействует, в том числе, с белком BAF, играющим важную роль в восстановлении ядерной оболочки после деления клетки?

3. Одним из результатов работы является обнаружение повышенной способности к кардиогенной дифференцировке ИПСК, несущих мутацию *LMNA* R249Q. В чем, по мнению автора, заключается опасность подобной ускоренной дифференцировки и как она может быть связана с нарушением функциональных способностей кардиомиоцитов?

4. При описании результатов исследования автор обращает внимание на изменение морфологии ядер (так называемое «пузырение» ядерной мембраны), наблюдаемой в клетках мезенхимных клетках сердца крысы, экспрессирующих *LMNA* R482L, *LMNA* R257C и *LMNA* R471. Наблюдались ли подобные изменения на других экспериментальных моделях, изученных в работе? Если нет, то с чем могут быть связаны подобные различия в проявлении разных мутаций *LMNA*?

5. Могут ли полученные результаты использоваться для разработки терапевтических подходов для лечения тканеспецифичных ламинопатий?

Также можно сделать несколько замечаний редакционного характера.

1. В работе (в том числе в названии) автор использует понятие «тканеспецифичные мутации». Этот термин вызывает вопросы, поскольку, если понимать его буквально, следует полагать, что те или иные мутации в гене *LMNA*, могут возникать только в какой-то одной ткани (и не могут возникать в других). На самом деле, как следует из содержания работы, имеются в виду мутации, которые могут присутствовать в клетках любой ткани, но проявляются только в какой-то одной (некоторых) тканях. Понятно, что термин «тканеспецифичные мутации» удобен благодаря своей краткости, однако автору следовало объяснить его в начале работы, непосредственно в разделе «Введение». Автор же объясняет, какие именно мутации анализировали в работе, только в разделе «Заключение» («...в данном исследовании использовались точечные мутации в гене *LMNA*, ассоциированные с той или иной тканеспецифичной формой заболеваний», с. 79).

2. В разделе «Введение» цитируется литература не позднее 2017 года издания. Учитывая быстрые темпы развития клеточной и молекулярной биологии, автору следовало использовать для обоснования актуальности и новизны своего исследования также и статьи, вышедшие в последние пять лет.

3. Возможно, автору следовало бы несколько сузить цель своей работы, указав, что в исследовании будут использованы клетки мезенхимного происхождения.

4. Поскольку в работе было проанализировано влияние нескольких мутаций в гене *LMNA*, имеющих тканеспецифичные проявления, было бы полезно представить в работе краткую обобщенную информацию (например, в виде таблицы) об этих мутациях (в каких структурных доменах белка они локализованы, в каких тканях проявляются, с какими заболеваниями ассоциированы).

5. В подписи к рис. 1 не расшифрованы буквенные обозначения, используемые на рисунке.

6. На с. 43 говорится об анализе эффективности трансдукции клеток *эндогенными* формами *LMNA*. По-видимому, это опечатка и имеются в виду *экзогенные* формы?

7. На с. 70 автор пишет: «Иммуноцитохимическое окрашивание дифференцирующихся кардиомиоцитов выявило увеличение уровня экспрессии тропонина Т и тропомиозина». Данная формулировка кажется недостаточно корректной, поскольку иммуноцитохимическая реакция не позволяет объективно оценить уровень экспрессии продукта того или иного гена (в отличие от RT-PCR), тем более в данном случае речь идет только о качественной оценке конфокальных изображений без проведения количественного анализа интенсивности флуоресцентного свечения.

8. В тексте встречаются стилистические неудачные выражения, например: «Геномная ДНК ... широко упакована в хромосомы» (с. 19); «анализ эффективности заражения клеток разными формами ламина» (с. 43); «длины контрольных миотрубок ... содержали более 15 ядер» (с. 44). Помимо этого в работе весьма велико число опечаток.

Тем не менее, все перечисленные вопросы и замечания имеют исключительно дискуссионный или редакционный характер и ни в коей мере не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования К.И. Перепелиной.

Диссертация Перепелиной Ксении Игоревны на тему: «Влияние тканеспецифичных мутаций в гене *LMNA* на процесс дифференцировки клеток»

соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Перепелина Ксения Игоревна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.22. Клеточная биология. Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не установлены.

Член диссертационного совета
доктор биологических наук, доцент
в.н.с. Института цитологии РАН



Боголюбова И.О.

24 апреля 2023 г.

