

ОТЗЫВ

председателя 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 темы диссертационной работы

Диссертация Перепелиной Ксении Игоревны посвящена изучению влияния тканеспецифичных мутаций в гене *LMNA* на процесс дифференцировки клеток.

Ламины А типа являются основными структурными белками ядерной оболочки клетки и относятся к классу промежуточных филаментов V типа. Ядерная ламина не только обеспечивает прочность ядерной мембраны клетки, но и играет важную роль в регуляции экспрессии генов и определении судьбы клеток. Доказано участие ламина А/С в организации хроматина, репликации ДНК, регуляции транскрипции генов, дифференцировке клеток и др. Ламинопатии представляют собой широкую группу заболеваний, ассоциированных с мутациями в гене ламина А/С (*LMNA*). Клинические фенотипы ламинопатий крайне разнообразны и включают кардиомиопатии, миопатии и миодистрофии, нарушения ритма, поражение центральной и периферической нервной системы, а также прогерия. Несмотря на большую актуальность данных исследований в связи с тяжестью течения и неблагоприятным прогнозом большинства ламинопатий, механизмы влияния ламины на развитие столь различных заболеваний с поражением разных систем и органов, остаются нераскрытыми. Понимание механизмов влияния мутаций в гене *LMNA* на функции ламин и развитие патологий представляется крайне актуальным в связи со стремительным ростом описаний новых форм ламин-ассоциированных заболеваний. Таким образом раскрытие механизмов влияния ядерных ламин А-типа на дифференцировку клеток является актуальным направлением как с точки зрения фундаментальной биологии, так и с точки зрения практического применения. В связи с вышесказанным диссертационная работа Перепелиной Ксении Игоревны является весьма актуальной и своевременной.

Для достижения цели диссертации и решения поставленных задач, автор использует интегральный подход, сочетающий методы генетической инженерии, биохимии, иммуноцитохимии, различные виды ПЦР, метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp) и анализ транскриптов. Использование этих методов позволило получить информацию, отличающуюся новизной и представляющую практический интерес. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

Научная и практическая значимость работы

Полученные Перепелиной К.И. результаты, бесспорно, обладают научной новизной. Автором впервые использовано несколько типов клеточных моделей клеток мезенхимного происхождения, а также индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) для анализа тканеспецифичного механизма развития ламинопатий. Этому способствовала доступность широкого спектра мутаций в гене *LMNA*. Была выявлена связь различных

аллелей гена *LMNA* с активностью сигнального пути Notch, что позволило сделать вывод о взаимодействии этого белков пути с ламинами типа А. Автором получены новые данные о свойствах кардиомиоцитов, полученных из ИПСК пациента с *LMNA* R249Q мутацией, на электрофизиологическом и экспрессионном уровне. Показано, что мутация приводит к повышению кардиогенного потенциала ИПСК, в то же время, КМЦ с данной мутацией характеризуются замедлением кинетики потенциал-зависимого сердечного натриевого канала Nav 1.5.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Обоснованность научных положений и выводов подтверждается приведенными результатами, которые получены при использовании различных современных методов, адекватных поставленным задачам, и статистически обоснованы. Основные результаты работы были представлены на отечественных и международных научных конференциях и опубликованы в отечественном и двух международных научных журналах, относящихся к первому и второму квартилю.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Перепелиной К.И. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводов, списка сокращений и цитированной литературы. Работа изложена на 93 страницах, содержит 34 рисунка и 4 таблицы. Список цитируемой литературы содержит 263 источника.

Во введении автор подчеркивает актуальность проблемы, формулирует цель и задачи исследования, характеризует новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, приводит положения, выносимые на защиту и сведения о представлении полученных результатов.

Обзор литературы посвящен организации ядерной ламина и ее роли в регуляции экспрессии генов. Особое внимание уделено ламинам типа А/С. Рассмотрены структурные домены ламинов: центральный α -спиральный стержневой домен, короткий глобулярный N-терминальный «головной» домен и длинный С- терминальный «хвостовой» домен, их функции и посттрансляционные модификации. Подробно рассмотрены последовательные стадии процессинга преламина А во время созревания.

Следующий раздел посвящен белкам, благодаря взаимодействию с которыми, ламина А-типа способны выполнять множество функций клетки, от стабилизации формы ядра до участия в более сложных процессах таких как клеточная пролиферация, миграция, сигнальная трансдукция, клеточная дифференцировка и другие. Подробно рассмотрены на три основные группы ламин-ассоциированных белков, обеспечивающих механическую поддержку ядра, регулирующих экспрессию генов и организацию хроматина и компоненты сигнальной системы клетки.

В разделе, посвященном участию ламина А/С в тканеспецифической регуляции дифференцировки клеток рассмотрена роль ламина А/С в передаче механических сигналов, опосредующих дифференцировку клеток и в регуляции организации хроматина и экспрессии генов, в котором подробно рассмотрено влияние ламин-ассоциированных доменов на транскрипцию. Особый интерес представляет раздел, посвященный

взаимодействию ламина А/С с сигнальными путями во время дифференцировки клеток. Подробно рассмотрены сигнальные пути Wnt / β -катенин, Notch, TGF- β / Smad, MAPK (ERK).

В последнем разделе обзора литературы подробно рассмотрен спектр заболеваний, вызванных мутациями в гене *LMNA*. Наиболее известные формы ламинопатий демонстрируют, что мутации в одном и том же гене *LMNA* могут приводить к развитию серьезных аномалий, характеризующихся широким спектром клинических фенотипов. Механизм развития этих заболеваний до сих пор полностью не изучен. Этот раздел обосновывает цели настоящей работы. Обзор литературы достаточно полно отражает состояние исследований в рамках темы диссертационной работы, написан хорошим языком и хорошо иллюстрирован.

В главе «**Материалы и методы**» представлены использованные в работе методы клеточной биологии, молекулярной биологии, биохимии, транскриптомного и иммуноцитохимического анализа, флуоресцентной микроскопии, метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp), приведены сведения о средах и условиях культивирования клеток млекопитающих. Все использованные методы адекватны поставленным задачам и свидетельствуют о хорошей методической подготовке автора.

В главе «**Результаты**», которая состоит из 4 подразделов, представлены экспериментальные данные, позволившие автору решить поставленные задачи, получить новые интересные результаты, касающиеся свойств белка *LMNA*.

В первом разделе с целью оценки влияния мутантных форм ламина на процесс мышечной дифференцировки (формирование миотрубок), использовали сателлитные клетки мыши, которые трансдуцировали лентивирусом, несущим гены *LMNA* G232E или *LMNA* R571S и в качестве контроля - лентивирусом, несущим *LMNA* WT. Показано, что мутации приводят к образованию миотрубок с нарушенным процессом расхождения ядер и характеризуются меньшей длиной по сравнению с контролем. Удалось показать, что мутации в гене *LMNA* связаны с нарушением процесса расхождения ядер к полюсам при формировании миотрубок. Анализ экспрессии генов миогенных маркеров в клетках линии C2C12 показал, что мутации в гене *LMNA* (*LMNA* G232E и *LMNA* R571S) при мышечной дифференцировке по-разному влияют на уровень транскрипции в изучаемых генах.

Автору удалось показать, что мутации *LMNA*, ассоциированные с развитием скелетно-мышечного фенотипа, приводят к сниженной способности миобластов формировать миотрубки, а также к увеличенной экспрессии ранних и сниженной экспрессии поздних маркеров миогенеза.

Второй раздел посвящен изучению влияния мутаций в гене *LMNA* на процесс адипогенной дифференцировки. Было показано, что мезенхимные клетки сердца способны дифференцироваться в адипогенном направлении и в этот процесс вовлечен сигнальный путь Notch. Было обнаружено влияние мутации *LMNA* R482L на морфологию ядер в трансдуцированных клетках, что может нарушать взаимодействие между ламинами и хроматином. На уровне экспрессии генов показали, что введение в клетки мутантной формы *LMNA* R482L приводит к снижению экспрессии генов-мишеней сигнального пути Notch, то есть мутантные формы ламина оказывают негативное влияние на

функционирование сигнального пути Notch. На основании полученных результатов сделано заключение о том, *LMNA* R482L ингибирует адипогенную дифференцировку мезенхимных клеток сердца в условиях активации сигнального пути Notch.

В третьем разделе было изучено влияние *LMNA* мутаций на развитие костного фенотипа ламинапатий. Изучали остеогенную дифференцировку и активность сигнального пути Notch в нескольких типах клеток мезенхимного происхождения. Для этого были выбраны мутации, связанные с серьезным нарушением процесса остеогенной дифференцировки и проведено сравнительное изучение действия этих мутаций на остеогенную дифференцировку и активность Notch в четырех типах клеток человека мезенхимального происхождения. Анализ экспрессии генов Notch показал, что изменение белков ламины за счет мутаций в гене *LMNA* подавляют функционирование сигнального пути Notch. Сравнительный анализ уровней экспрессии генов-мишеней сигнального пути Notch и остеогенных маркеров в четырех недифференцированных линиях показал, что, несмотря на общее мезенхимное происхождение, ЭК, МКС, ГМК, ИК имеют очень разные уровни экспрессии анализируемых генов.

Четвертый раздел посвящен исследованию эффекта пациент-специфической мутации в гене *LMNA* на процесс кардиогенной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека. Для моделирования процесса кардиогенной дифференцировки были выбраны индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), несущие мутацию в гене *LMNA* (R249Q). Также в качестве контролей были использованы две линии ИПСК, полученные от здоровых доноров. Для того, чтобы исследовать изменение экспрессии кардио-специфичных генов в *LMNA* R249Q-КМЦ использовали метод ПЦР в режиме реального времени. Показали что, *LMNA* R249Q ИПСК-КМЦ продемонстрировали повышенный уровень экспрессии мезодермальных и кардио-специфичных факторов транскрипции, а также саркомерных генов, что указывает на общую дисрегуляцию профиля экспрессии генов ИПСК-КМЦ, вызванную патогенным влиянием мутации *LMNA* R249Q. Была проведена электрофизиологическая характеристика кардиомиоцитов, полученных из ИПСК пациента с мутацией *LMNA* R249Q и показано, что мутация *LMNA* R249Q приводит к изменению функциональной активности натриевых каналов ИПСК-КМЦ, отражая комплексное влияние мутации *LMNA* на электрофизиологические свойства кардиомиоцитов пациента, что возможно указывает на механизм развития аритмии.

В разделе **Заключение** автор анализирует результаты и делает вывод, что дифференцировка клетки зависит от комплекса факторов, в том числе от определенной мутации *LMNA*, степени активности сигнального пути Notch, а также от происхождения самой клетки.

Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам, вытекают из проведенных экспериментов, четко сформулированы, аргументированы и достоверны.

При ознакомлении с диссертацией возник ряд вопросов и замечаний:

Вопросы:

1. А первом разделе результатов был произведен сравнительный анализ эффективности заражения клеток лентивирусом, содержащим разные формы гена

ламина. Известны ли случаи, когда замены нуклеотидов (в данном случае в гене *LMNA*) влияли на эффективность трансдукции?

2. По мнению автора «Сравнительный анализ уровней экспрессии генов-мишеней сигнального пути Notch и остеогенных маркеров в четырех недифференцированных линиях показал, что, несмотря на общее мезенхимное происхождение, ЭК, МКС, ГМК, ИК имеют очень разные уровни экспрессии анализируемых генов». Связаны ли эффекты мутаций только с пространственным положением хромосом? Возможно ли непосредственное участие ламина А как регулятора транскрипции вне связи с ламинной?
3. К числу замечаний можно отнести довольно большое количество опечаток, и неточностей, так «для модификации генома клетки линии C2C12 и первичные сателлитные клетки мыши трансдуцировали концентратом лентивирусных частиц (5 MOI), несущих разные формы человеческого ламина» (стр.43), лучше все-таки использовать «гена, кодирующего ламин».

Высказанные замечания и вопросы не затрагивают основных результатов и выводов диссертации и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Диссертационная работа Перепелиной Ксении Игоревны является научно-квалификационной работой, которая вносит существенный вклад в понимание механизмов влияния ядерных ламинов А-типа на дифференцировку клеток является актуальным направлением как с точки зрения фундаментальной биологии, так и с точки зрения практического применения. Применение нескольких клеточных моделей, используемых для воссоздания картины заболеваний, вызванных мутациями в гене *LMNA*, позволит ближе приблизиться механизму развития тканеспецифичных нарушений. Полученные данные представляют интерес для специалистов в области молекулярной генетики, биохимии, молекулярной медицины.

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 обнаружены.

Председатель диссертационного совета

Д.б.н., доцент, профессор кафедры генетики и биотехнологии

(Самбук Е.В.)



15 мая 2023 г.