

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Галиакберовой Адели Альбертовны на тему: «Подходы к моделированию нейрогенеза *in vitro* при помощи индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека» по специальности 1.5.22 – Клеточная биология.

Актуальность избранной темы.

Нейрогенез в целом и функционирование определенных типов нейрональных клеток человека в настоящее время малоизученная область науки. Однако это крайне востребованная область знаний для понимания этиологии возникновения большинства нейродегенеративных заболеваний, как, впрочем, и для оценки функционирования тех или иных типов нейрональных и глиальных клеток. При этом изучение эмбрионального и постнатального нейрогенеза, как и выделение первичных культур нейронов и нейрональных стволовых клеток человека, затруднено по этическим причинам.

Нейрогенез – это многоступенчатый процесс развития нейронов из клеток-предшественников. Наиболее активно нейрогенез протекает в эмбриональном периоде и продолжается в течение раннего постнатального периода, а также и во взрослом мозге. В качестве клеток-предшественников выступают мультипотентные нейрональные стволовые клетки (НСК), которые способны к самообновлению и дифференцировке в различные типы нейрональных и глиальных клеток.

Нейрогенез *in vitro* отличается от такового, протекающего в мозге (*in vivo*), тем не менее оба процесса приводят к получению дифференцированных нейронов. При этом скорость получения и количество типов нейронов *in vitro* сильно зависит от протокола, применяемого

исследователем. В литературе встречаются десятки таких протоколов с различными модификациями для получения тех или иных типов нейронов. Наиболее подходящим источником нейронов или их предшественников *in vitro* являются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). ИПСК характеризуются длительной способностью к самообновлению и наличием потенциала к дифференцировке в любой тип клеток трех зародышевых слоев. ИПСК обладают неограниченным пролиферативным потенциалом, их можно поддерживать в культуре при определенных условиях в течение многих лет, а так как получить их можно из соматических клеток, это снимает вопрос этичности исследований.

В результате полученные из ИПСК культуры нейронов и НСК дают возможность изучать фундаментальные процессы нейrogenеза, они могут быть использованы для моделирования различных неврологических и нейродегенеративных заболеваний, в том числе генетически наследуемых, в качестве тест-систем для поиска потенциальных лекарственных веществ.

Одной из основных проблем в данной области является выбор подхода и протокола дифференцировки нейронов, и способов их культивирования. Поэтому выявление основных преимуществ и недостатков различных подходов, а также их сравнение, является актуальной задачей современной клеточной биологии.

Исходя из вышеизложенного, диссертационная работа Галиакберовой Адели Альбертовны, посвященная изучению подходов к моделированию нейrogenеза *in vitro* при помощи индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека, является безусловно актуальной и востребованной в настоящее время, а степень обоснованности положений, выносимых на защиту, не вызывает сомнений.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 173 страницах машинописного текста, содержит 35 рисунков и 3 таблицы.

Глава «Введение» посвящена описанию состояния проблемы, обоснованию актуальности диссертационного исследования, постановке цели и задач работы. В этой главе также описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы и сформулированы положения, выносимые на защиту, приведен список опубликованных по теме диссертации работ и вклад автора в работу.

Глава «Обзор литературы» состоит из четырех основных подразделов.

Первый подраздел посвящен описанию нейральных стволовых клеток и нейрогенезу. В следующем подразделе автор подробно описывает сигнальные пути, задействованные в нейрогенезе. В третьем подразделе автор рассматривает плюрипотентные стволовые клетки как источник для получения нейральных культур *in vitro*. В последнем подразделе подробно описываются методы дифференцировки нейронов *in vitro* из плюрипотентных стволовых клеток. Особое внимание уделяется двум методам: дифференцировке с помощью гиперэкспрессии транскрипционных факторов и методу с DUAL SMAD ингибированием.

В целом обзор написан достаточно подробно, снабжен иллюстрациями, облегчающими восприятие текста. Автором приводится большое количество источников литературы последних лет, а также более ранних, что свидетельствует о внимательном и глубоком ознакомлении с проблематикой, которой посвящена диссертационная работа.

В главе «Материалы и методы» автор описывает схемы и протоколы проведенных экспериментов. Для решения поставленных задач был выбран адекватный набор современных методов иммунологии, молекулярной и клеточной биологии: культивирование ИПСК, получение стабильно трансфицированных линий ИПСК, нейральная дифференцировка методом с DUAL SMAD ингибированием, а также NGN2-индуцированная дифференцировка ИПСК, проточная цитофлуориметрия, приготовление препаратов клеток и тканей и иммунофлуоресцентная детекция антигенов, ПЦР в реальном времени, секвенирование РНК, а также секвенирование РНК единичных клеток (scRNA-seq), кальциевый имиджинг.

В целом, материал, изложенный в этой главе, свидетельствует о хорошей методической подготовленности автора к решению задач настоящей работы.

В главе «Результаты» автор последовательно излагает полученные результаты. На первом этапе работы автор исследовал дифференцировку ИПСК в нейроны с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием. В исследовании были использованы линии ИПСК, полученные из разных клеточных источников: фибробластов ИПСК-KYOU, амниотической жидкости ИПСК-AFS17, дермальной папиллы ИПСК-DP, дермальных фибробластов донора-пациента с синдромом Дауна ИПСК-DYP0730, а также ранее полученная трансгенная линия ИПСК-KYOU- GCaMP6s, стабильно экспрессирующая флуоресцентный кальциевый индикатор GCaMP6s. Из всех линий ИПСК с помощью метода с DUAL SMADi были получены нейральные предшественники. Нейральные клетки были исследованы на разных стадиях спонтанной дифференцировки методами ПЦР, иммуноцитохимически, РНК секвенирования, а также определена их функциональная активность. Было показано, что и НСК, и нейральные культуры, полученные путем спонтанной дифференцировки, имели очень неоднородный по морфологии клеточный

состав. Анализ уровней экспрессии маркерных генов методами иммуноцитохимического окрашивания и количественной ОТ-ПЦР также показал значительные различия между нейральными культурами четырех линий (N-KYOU, N-AFS17, N-DP и N-DYP0730), при этом для линии KYOU-GCaMP6s было показано, что только небольшая часть клеток демонстрирует кальциевую активность в ответ на добавление глутамата. Далее было исследовано, как продолжительность культивирования НСК (KYOU, AFS17) влияет на их дифференцировочный потенциал и спектр клеточных типов в нейральных культурах. Не было отмечено значительных изменений ни в скорости пролиферации культур, ни в морфологии клеток с 5-го по 30-й пассаж.

Результаты анализа уровней относительной экспрессии маркерных генов с помощью количественной ОТ-ПЦР в более дифференцированных нейральных культурах N-KYOU и N-AFS17, полученных на разных пассажах, подтвердили значительные различия между обеими культурами как на одном пассаже, так и между разными пассажами в одной культуре. С помощью РНК секвенирования было показано, что основной вклад в различия дифференцированных нейральных культур вносит длительность культивирования НСК (количество пассажей). Для более точного понимания в изменениях клеточных популяций автор использовал метод секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq). В результате проведенного анализа автор делает утверждение, что нейральные культуры, спонтанно дифференцированные из НСК, представляют собой гетерогенные культуры, состоящие из различных клеточных популяций, соотношение которых изменяется с увеличением длительности культивирования НСК.

На втором этапе работы автор исследует дифференцировку ИПСК в нейроны с индукцией экзогенной гиперэкспрессии *NGN2*. Для этого были получены две линии ИПСК: ИПСК-KYOU-TetON-NGN2, несущая трансген *NGN2* и системы трансаактивации TetON, а также ИПСК-KYOU-GCaMP6s-

TetON-NGN2, несущая трансген *NGN2* и экспрессирующая флуоресцентный кальциевый индикатор GCaMP6s. С помощью ОТ-ПЦР и иммуноцитохимическим методом было показано, что протокол NGN2-индуцированной дифференцировки ИПСК позволяет получить относительно гомогенную культуру нейронов человека, не содержащую глиальные клетки. Полученные нейроны реагировали на добавление глутамата повышением концентраций Ca^{2+} и Na^{+} внутри клетки, также была отмечена доминирующая роль ионотропных глутаматных рецепторов в передаче сигналов Ca^{2+} в NGN2-индуцированных нейральных культурах.

На следующем этапе работы автор проводит сравнение нейральных культур, полученных из одной и той же линии ИПСК-KYOU, но разными методами. Результаты анализа транскриптомных профилей показали значительные различия между нейральными культурами. Показано, что нейральные культуры с экзогенной гиперэкспрессией *NGN2* обогащены процессами, связанными с межклеточными взаимодействиями и сигналингом, организацией синапсов, нейрональной синаптической пластичностью и трансмиссией, различными синаптическими процессами, включая экзоцитоз и секрецию нейротрансмиттеров, генерацией потенциалов действия, а также аксоногенезом. В то же время, в нейральных культурах, полученных с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием более выражены процессы, связанные с регуляцией и прогрессией клеточного цикла, митотическими процессами и делением, регуляцией транскрипции, метаболизмом РНК и макромолекул, эмбриогенезом, развитием нервной трубки и нервной системы, а также клеточной адгезией и миграцией. Таким образом, автором убедительно показаны различия нейрональных клеточных популяций, полученных двумя методами дифференцировки ИПСК.

Изложение полученных результатов построено логично, грамотно и понятно.

Основные полученные результаты и их оригинальность.

Автором была исследована вариабельность нейральных культур в зависимости от источника линии ИПСК, а также в зависимости от длительности культивирования НСК на примере спонтанной дифференцировки НСК, полученных с помощью метода с DUAL SMAD ингибированием. Впервые показано, что линии ИПСК, полученные из разных типов клеток, образуют неодинаково гетерогенные нейральные культуры. Источником таких различий, вероятно, являются генетические и эпигенетические свойства линий ИПСК. Длительное культивирование НСК приводит к изменениям транскрипционного профиля, причем динамика этих изменений не одинакова в нейральных культурах двух разных линий.

Автором также были получены новые линии ИПСК с гиперэкспрессией NGN2. С помощью транскриптомного анализа установлено, что полученные нейральные производные проходят «ускоренную» дифференцировку. Впервые на модели с генетически кодируемым кальциевым индикатором GCaMP6s показано, что культура NGN2-индуцированных нейронов является функционально активной, отвечает на воздействие глутамата и демонстрирует наличие активных глутаматных NMDA и AMPA и/или каинатных рецепторов.

При сравнении двух подходов дифференцировки на одной линии ИПСК было показано, что гиперэкспрессия NGN2 приводит к повышенной экспрессии генов-маркеров холинергических и глутаматергических нейронов. При этом в целом популяция нейральных клеток является более гомогенной и имеет зрелый фенотип по сравнению с клетками, полученными методом с DUAL SMAD ингибированием. Важно, что автором отмечаются преимущества и недостатки каждого из подходов.

В главе «Заключение» автор подводит итоги проведенной работы и отмечает перспективность разработанных подходов для дальнейших исследований. С точки зрения Галиакберовой Адели Альбертовны результаты настоящей работы дают возможность исследователю более

уверенно ориентироваться в выборе метода получения нейральных производных из ИПСК в зависимости от поставленных задач.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты исследования имеют важное значение как для фундаментальной (изучение дифференцировки нейронов человека *in vitro*), так и для прикладной (выбор оптимального протокола под задачи исследователя) нейробиологии. Полученные с помощью современных методов исследования данные в значительной степени расширяют наше понимание стадий дифференцировочного процесса и вариабельности получаемых типов клеток, что может способствовать разработке оптимальных нейральных моделей для скрининга лекарств, а также изучения нейрогенеза и заболеваний нервной системы. Результаты работы свидетельствуют о необходимости тщательного выбора не только подхода для нейрональной дифференцировки, но и типа клеток, из которых получены ИПСК, так как все это сильно сказывается на конечном результате.

Достоверность результатов работы не вызывает сомнений, поскольку они базируются на достаточном объеме экспериментального материала. Достоверность результатов подтверждается также их воспроизводимостью и использованием современных методов исследования и статистической обработки.

Выводы диссертации обоснованы и логично вытекают из полученных результатов и их обсуждения. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Замечания, комментарии и вопросы к представленной работе.

Принципиальных замечаний по диссертационной работе не имеется. Работа производит очень хорошее впечатление. Но есть ряд вопросов к автору диссертационного исследования:

1. Из работы понятно, что ИПСК, дифференцированные методом с DUAL SMAD ингибированием, дифференцируются и приобретают зрелый фенотип медленнее, чем ИПСК несущие трансген *NGN2*, при этом, по мере культивирования первые заметно продвигаются в нейрональной дифференцировке к 25 пассажу. В связи с этим кажется логичным взять более поздний пассаж для ИПСК, дифференцированных методом с DUAL SMAD ингибированием, почему выбран был именно 5 пассаж?
2. В настоящее время известно, что ИПСК, полученные из разных типов клеток, имеют свои предпочтительные потенции в дифференцировке, о чем автор также пишет в своей работе. Из этого следует, что сравниваемые две линии ИПСК, полученные из разных источников (дермальные фибробласты и амниотическая жидкость) будут неодинаково дифференцироваться в нейрональном направлении и, тем не менее, в работе именно они сравниваются при длительном культивировании. Возможно, более правильным было бы сравнить две линии ИПСК, полученные из одного типа клеток, например, из дермальных фибробластов?

Заключение.

Вместе с тем, указанные выше замечания не снижают значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.22 – Клеточная биология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени

кандидата наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Галиакберова Аделя Альбертовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – Клеточная биология.

Официальный оппонент:
кандидат биологических наук,
начальник Лаборатории клеточной дифференцировки
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»

Новосадова Екатерина Вячеславовна

Контактные данные:

тел.: 7(91 80, e-mail: no_ mail.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.00.25 «гистология, цитология, клеточная биология»,

03.00.26 «молекулярная генетика»

Адрес места работы:

123182, г. Москва, пл. ак. Курчатова, д. 2, Национальный исследовательский
центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»)

Тел.: 8(499), 11, e-mail: no_ mail.ru

Подпись сотрудника НИЦ «Курчатовский институт»

Новосадовой Е.В. удостоверяю:

Главный Ученый секретарь

НИЦ «Курчатовский институт»

К.Е. Борисов

23.09 2024 г.

