

ОТЗЫВ

официального оппонента Гривенникова Игоря Анатольевича на диссертацию Рысенковой Марины Дмитриевны на тему «Молекулярные механизмы участия урокиназного рецептора в дифференцировке и выживаемости клеток нейробластомы мыши», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия

Актуальность избранной темы. Выяснение механизмов дифференцировки и регенерации нервных клеток в организме является важнейшей задачей современной нейробиологии и регенеративной медицины. Поскольку для облегчения роста нервов и миграции нервных клеток необходим протеолиз белков внеклеточного матрикса, то весьма вероятно, что повышение содержания компонентов урокиназной системы и их активности, возникающее при травме нерва в зоне повреждения необходимо для его регенерации. Известно, что система активатора плазминогена урокиназного типа, состоящая из сериновой протеазы урокиназы (uPA) и ее рецептора (uPAR), не только запускает каскад протеолиза белков внеклеточного матрикса, но и обладает рядом сигнальных эффектов, таких как стимуляция миграции, пролиферации и дифференцировки клеток. Ранее было показано, что введение плазмиды, содержащей ген *uPA*, ускоряет восстановление морфологии нерва и его проводимости, что характерно для классических нейротрофинов. Кроме того, оказалось, что рост нейритов в клетках нейробластомы *in vitro* в условиях депривации по сыворотке приводит к секреции активаторов плазминогена на конусе роста нейритов. При этом миграция нейронов и рост нейритов/нейритогенез имели характерную дозовую зависимость от *uPA*: чем больше была концентрация урокиназы в среде культивирования, тем сильнее был ее эффект на клетки. Известно, что сигнальная функция *uPA* в клетках реализуется при взаимодействии *uPA* со своим рецептором *uPAR*. Хотя, к настоящему времени, и были получены некоторые данные относительно вовлеченности урокиназной системы в процесс регенерации нервов, однако молекулярные механизмы такого участия *uPA* и ее рецептора в пролиферации и выживаемости нейронов, а также в их дифференцировке и нейритогенезе оставались не выясненными. В свете этого работа Рысенковой К. Д., посвященная

исследованию молекулярных и клеточных механизмов, опосредующих участие рецептора урокиназы (uPAR) в процессах дифференцировки и выживаемости клеток нейробластомы мыши линии Neuro2a является безусловно актуальной и востребованной в настоящее время.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 183 страницах, состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения и списка цитированной литературы. Список литературы включает 354 публикации отечественных и иностранных авторов. Диссертационная работа иллюстрирована 3 таблицами и 37 рисунками.

В главе «Обзор литературы», разделенном на три подраздела, автор сначала рассматривает систему активатора плазминогена урокиназного типа. Подробно описаны свойства урокиназы и ее рецептора. Описаны взаимодействия uPAR с рецепторами на поверхности клетки, такими как интегрины, EGFR, PDGFR и рядом других. Представлены основные сигнальные молекулы, входящие в интерактом урокиназного рецептора. Автор описывает и физиологическое значение урокиназной системы в организме. Другой подраздел посвящен механизмам нейрональной дифференцировки при развитии нервной системы и подходам к ее индукции, в частности, *in vitro*. В данном подразделе основное внимание уделено факторам роста дифференцировки (таким как нейротрофины и EGF) и их рецепторам. Рассматривается внутриклеточная сигнализация, которая опосредует нейрональную дифференцировку и выживаемость нейронов при связывании с клеткой различных факторов роста. Также внимание автор уделяет механизмам роста аксонов и их ветвлению, а также основным классам навигационных молекул, опосредующих эти процессы. Отдельное внимание автор уделяет индукции нейрональной дифференцировки линии клеток Neuro2a мыши, так как в экспериментальной части работы были использованы именно эти клетки. В третьем подразделе автор описывает современные молекулярно-генетические стратегии манипуляции с экспрессией генов в культурах клеток млекопитающих. Рассмотрены подходы к подавлению экспрессии генов с помощью РНК-интерференции и редактирования генома. Обзор написан достаточно подробно, с привлечением большого количества источников литературы последних лет.

Чувствуется, что автор хорошо знаком с проблематикой, которой посвящена диссертационная работа.

В главе «Материалы и методы» представлены современные методы биохимии, клеточной и молекулярной биологии. Некоторые из них перечислены ниже. Получение и культивирование спинальных ганглиев мыши в Матригеле и культивирование клеток Neuro 2a мыши и индукция их дифференцировки. Молекулярно-генетические манипуляции с геном *uPAR*: подавление, нокаут и гиперэкспрессия *uPAR* в этих клетках с помощью таких подходов как РНК-интерференция и технология CRISPR/CAS9. Иммунофлуоресцентное окрашивание эксплантной культуры спинальных ганглиев и клеток Neuro2a на разных стадиях дифференцировки. Электрофорез белков и иммуноблоттинг. Анализ деградации ДНК методом ДНК комет и количественный анализ содержания мРНК методом ПЦР в реальном времени. Отдельный подраздел посвящен статистической обработке результатов. В принципе данный раздел написан достаточно подробно и позволяет воспроизвести приведенные автором методы. Используемые Рысенковой К. Д. методы позволили, на мой взгляд, решить задачи сформулированные в диссертации.

В главе «Результаты и их обсуждение» автор последовательно решает поставленные в диссертации задачи не забывая оценить и обсудить их. Большое внимание в этой главе уделено молекулярно-генетическим экспериментам по конструированию векторов для трансфекции клеток нейробластомы мыши (линия Neuro 2a) и получению уникальных линий клеток с повышенной и пониженной экспрессией *uPAR*, а также с полным нокаутом данного гена с помощью технологии CRISPR/CAS9. Получение таких линий клеток позволило автору в дальнейшем изучить молекулярные и клеточные аспекты вовлеченности *uPA-uPAR* системы в процессы пролиферации, дифференцировки и клеточной гибели клеток Neuro 2a.

В результате выполненной работы Рысенковой К. Д. удалось получить новые и приоритетные данные. Так, впервые, автором были получены линии клеток Neuro2a, стабильно гиперэкспрессирующие *uPAR*, а также,

с использованием технологии CRISPR/Cas9 клетки Neuro 2a с подавленной экспрессией *uPAR* и нокаутные по гену *uPAR*. Было установлено, что активность *uPAR* опосредовала направленный рост нейритов и выживаемость этих клеток. Блокирование активности *uPAR* вызывало формирование нейритов и усиливало их ветвление, сопровождаемое повышением экспрессии RIT1 и MAP2 – белков, ответственных за ветвление аксонов. Длительное блокирование *uPAR* приводило к гибели клеток по механизму деградации ДНК с участием белка PARP-1. При нокауте гена *uPAR* снижалась пролиферация клеток Neuro 2a и рост нейритов, что сопровождалось снижением уровня активной формы pERK1/2, ki 67 (маркера пролиферации) и активацией апоптоза по каспаза-3 зависимому пути. Кроме того было показано, что *uPAR* определяет активацию сигнализации с участием EGFR и ERK1/2; ибо его повышенная экспрессия вызывает фосфорилирование EGFR и ERK1/2 и стимулирует рост нейритов. При подавлении активности *uPAR* или нокауте *uPAR* уменьшалось содержание активных форм EGFR и ERK1/2 и падала выживаемость клеток. Важным и интересным явилось наблюдение автора относительно того, что нокаут *uPAR* снижал содержание мРНК полноразмерного рецептора TrkC и его внутриклеточного посредника киназы pAkt.

В главе «Заключение» Автор анализирует и суммирует полученные результаты и на их основании предлагает молекулярный механизм участия *uPAR* в дифференцировке и выживаемости Neuro 2a клеток.

При ознакомлении с работой возникает несколько вопросов, требующих пояснений, а также некоторые пожелания.

1. в разделе «Материалы и методы» хорошо бы ссылаться на интернет-ресурсы в случае проведения экспериментов по «протоколу производителя».
2. рис. 19. и текст к нему. Почему при полном нокауте гена *uPAR* в клоне № 6 все равно наблюдается экспрессия мРНК *uPAR* (15% от контроля). В клоне 3, экспрессия *uPAR* составляла всего 5% от контроля, но как я понимаю полного нокаута там не было.
3. Почему даже при трех раундах нокаута не наблюдается (в большинстве клонов) полной инактивации данного гена?

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в работе результаты могут быть использованы при разработке терапевтических подходов для восстановления иннервации при травмах различного генеза и нейродегенеративных заболеваниях, а также терапевтических препаратов комплексного воздействия на uPAR и рецепторные тирозиновые киназы Trk и EGFR, опосредующие выживаемость, дифференцировку и пролиферацию нервных клеток. Полученные результаты могут быть использованы при чтении спецкурсов для студентов биологических и медицинских специальностей по таким направлениям как молекулярная нейробиология, нейрохимия, регенеративная медицина.

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: на всех этапах применялись современные способы получения репрезентативных данных.

Выводы диссертации обоснованы и логично вытекают из полученных результатов и их обсуждения. Принципиальных замечаний по диссертационной работе не имеется. Указанные выше незначительные замечания не умаляют значимости очень важного и интересного исследования.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

По материалам диссертации опубликовано 18 печатных работ, в том числе 10 статей в научных рецензируемых изданиях, из них: 3 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК, 7 статей в журналах, индексируемых в Scopus, Web of Science и 8 публикаций в сборниках материалов Российских и международных конференций.

Заключение

Диссертационная работа Рысенковой Карины Дмитриевны на тему «Молекулярные механизмы участия урокиназного рецептора в дифференцировке и выживаемости клеток нейробластомы мыши» является самостоятельной, завершенной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной научной задачи современной биохимии и клеточной биологии установления молекулярных механизмов, опосредующих участие рецептора урокиназы (uPAR) в процессах пролиферации, дифференцировки и выживаемости клеток нейробластомы. По актуальности темы, методологическому подходу, объему выполненных диссертантом исследований, новизне полученных данных и их научно-практической значимости, опубликованным результатам, диссертационная работа Рысенковой К. Д. полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – биохимия.

доктор биологических наук, профессор,
заведующий Лабораторией молекулярной
генетики соматических клеток
НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ

Гривенников Игорь Анатольевич

123182, г. Москва, пл. ак. Курчатова, д.2, Федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ) тел.: 8499-1960014, e-mail: igorag@img.ras.ru

Подпись Гривенникова И.А. заверяю
заместитель директора
НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ,
доктор биологических наук, профессор



П.А. Сломинский

«25» ноября 2020 г.