

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, заведующего лабораторией клеточной физиологии и патологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева» Абрамова Андрея Юрьевича на диссертацию Кухарского Михаила Сергеевича на тему «Нарушение функций рибонуклеопротеиновых комплексов в патогенезе бокового амиотрофического склероза», представленной к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

1. Актуальность темы исследования. Диссертационная работа Кухарского Михаила Сергеевича, представляемая на соискание степени доктора биологических наук, посвящена исследованию патогенетических основ тяжелого неизлечимого нейродегенеративного заболевания – бокового амиотрофического склероза (БАС). Данное заболевание, как правило, поражает людей работоспособного возраста, становится причиной тяжелой инвалидности и быстро заканчивается летальным исходом. По современным оценкам в США каждый год диагностируют около 5000 новых случаев БАС. Современные подходы к терапии крайне ограничены и малоэффективны, что связывают, прежде всего, с недостатком информации о патогенезе БАС, особенно для спорадических форм заболевания, на долю которых приходится до 90% случаев. За последнее десятилетие был установлен целый ряд генетических нарушений, связанных с семейными формами БАС, которые стали широко использоваться в качестве мишеней для разработки терапий. Также были описаны патологические факторы, такие как глутаматная токсичность, белковая агрегация, нейровоспаление, нарушение метаболизма РНК, оксидативный стресс и т. д. Тем не менее, это не привело к значительному прогрессу в данной области и не позволило сформулировать универсальные механизмы повреждения двигательных нейронов при разных формах БАС. В настоящее время нет единой теории этиологии и патогенеза БАС. В связи с этим, становится все более очевидной необходимость выявления и изучения универсальных факторов, которые играют важную роль в развитии дегенеративных процессов в мотонейронах независимо от этиологии конкретного случая заболевания. Научная работа по идентификации и подробной характеристике новых патологических механизмов, запускающихся в двигательных нейронах больных БАС и характерных для большинства случаев заболевания является важным шагом к пониманию процессов, общих для наследственных и спорадических форм заболевания и к разработке эффективной патофизиологической терапии.

2. Научная новизна результатов исследования.

В работе впервые описывается механизм нарушения биогенеза микроРНК вследствие снижения уровня белка TDP-43 в ядрах клеток. Автор демонстрирует, что этот же механизм запускает сборку параспеклов, в образовании которых ключевую роль играет длинная некодирующая РНК Neat1. Причем с использованием клинического аутопсийного материала показано, что это является характеристической чертой патологии БАС. Дальнейшая часть работы посвящена подробному изучению роли Neat1 в функционировании нервной системы как на клеточном, так и на организменном уровне с использованием генетически модифицированной (нокаутной) линии мышей. В этой серии экспериментов автор убедительно доказывает, что Neat1 принимает участие в регулировании активности нейронов и в реализации ряда функций высшей нервной деятельности. Эти данные впервые демонстрируют, что Neat1 выполняет важную функцию в работе нервной системы, связанную с адаптацией к внешним условиям,

прежде всего к стрессу. С помощью транскриптомного анализа тканей нокаутных животных было выяснено, экспрессия и сплайсинг каких генов изменяется в ответ на недостаток *Neat1*. Выявленные гены-мишени и метаболические пути в которых они участвуют могут рассматриваться в качестве точек приложения для воздействия на процессы регуляции нервной деятельности, в том числе при патологических условиях. Еще одним новым научным результатом обсуждаемой работы является характеристика свойств белка CREST. Так же, как и TDP-43 он оказался связан с функционированием параспеклов, а также других РНП-комплексов – стресс-гранул. Таким образом, токсическое действие CREST при его агрегации, по крайней мере частично, можно объяснить нарушением функционирования упомянутых РНП-гранул. В целом данные диссертационного исследования формируют представление о том, что нарушение в работе РНП-комплексов является общим признаком при развитии различных форм БАС. Результаты проведенных экспериментов вскрывают некоторые механизмы активации сборки РНП-комплексов и их роль при нейродегенерации.

3. Научно-практическая значимость. Высокая значимость диссертационного исследования как для фундаментальной, так и для прикладной науки очевидна. Результаты исследования функционального значения *Neat1* расширяют существующие представления о длинных некодирующих РНК, интерес к которым стремительно растет. Устанавливается связь *Neat1* с белками (TDP-43, CREST, FUS), вовлеченными в развитие нейродегенеративных заболеваний. Эти белки уже хорошо изучены и на основе их мутантных форм разрабатываются модельные тест-системы для отбора потенциальных лекарственных препаратов. Однако результаты современных доклинических и клинических испытаний по большей части отрицательны. Это наводит на мысль о существовании неизвестных еще механизмов более общего порядка, которые определяют развитие патологического процесса, в том числе белковую агрегацию. На роль таких механизмов в данной работе предлагаются процессы, связанные с образованием и функционированием РНП-гранул. В частности, показано, что сборка параспеклов играет защитную роль для нейронов. Дальнейшие исследования в данной области должны показать перспективность воздействия на компоненты РНП-гранул с целью затормозить развитие нейродегенерации.

4. Структура и содержание работы. Диссертационное исследование М.С. Кухарского по своей структуре является традиционным, и состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащего 781 источник. Работа изложена на 311 страницах, содержит 5 таблиц и 65 рисунков.

Во введении кратко изложено современное состояние научных исследований по изучаемой проблеме, изложены цели и задачи работы. Задачи определяют направленность всего исследования: от анализа встречаемости РНП-комплексов параспеклов при БАС и характеристики механизмов их формирования, в том числе участие в этом БАС-ассоциированных белков, до исследования функционального значения главного компонента параспеклов РНК *Neat1*.

В первой главе обобщены и четко структурированы данные литературы по проблеме, исследуемой в рамках диссертационной работы. В разделе описан большой объем новых, полученных за последние годы, данных. Обзор составлен в стиле, соответствующем научным обзорным статьям в ведущих рецензируемых журналах, включает обобщенные результаты, полученные другими авторами и собственные выводы диссертанта. В целом, данная глава отражает объективное состояние научного знания в данной области.

Во второй главе «Материалы и методы исследования» подробно описана методологическая база проведенного исследования. В работе использован широкий набор методов, ряд из которых являются рутинными, такие как ПЦР, гистохимическая окраска, вестерн-блоттинг, центрифугирование и т.д., тогда как другие можно отнести к новейшим научным методам: целевой нокдаун генов в клеточной культуре с использованием siRNA, *in situ* гибридизация, иммунофлуоресцентные окраски, транскриптомный анализ. Следует отметить продуманный выбор методов поведенческого тестирования, использованных для фенотипирования нокаутной мышины линии, что позволило всесторонне охарактеризовать поведенческие особенности животных с инактивированным геном *Neat1*. В целом все представленные автором результаты были получены с помощью комплексных методологических решений, сочетающих в себе анализ изменений на биохимическом, клеточном и организменном уровнях, использование различных модельных систем, в частности разных типов клеток, от классической перевиваемой культуры SH-SY5Y до первичных нейрональных клеточных культур, полученных из тканей головного мозга мышей. Также был использован клинический материал от пациентов с БАС в виде срезов спинного мозга. Автором был проведен тщательный статистический анализ полученных данных, что позволяет с высоким доверием относиться к выводам, сделанным по результатам работы.

Глава «Результаты исследования и их обсуждение» разбита на логические разделы, в соответствии с задачами, обозначенными в начале работы. В главе детально описаны и наглядно проиллюстрированы полученные автором результаты. Первый подраздел описывает результаты исследования аутопсийного материала, полученного от пациентов со спорадическими и семейными формами БАС на наличие в клетках спинного мозга параспеклов. Автор указывает на то, что параспеклы обнаруживаются при всех формах БАС как в нейронах, так и в глиальных клетках. Основываясь на том, что самым часто встречаемым гистопатологическим признаком БАС являются агрегаты белка TDP-43, автор делает предположение, что именно этот белок может быть связан с активацией сборки параспеклов. В ходе дальнейших экспериментов было показано, что снижение уровня TDP-43 в ядрах клеток (в культуре) стимулирует образование параспеклов, тогда как повышение его уровня не оказывает такого эффекта. Анализируя клеточные процессы, в которых участвуют TDP-43 и параспеклы, автор справедливо отмечает, что биогенез микроРНК является общим для них. В подтверждение этого тезиса, направленное снижение уровня ключевых белков процессинга микроРНК приводило к увеличению числа параспеклов в клетках. В следующей серии изящных экспериментов на клеточных культурах автору удается обнаружить еще один механизм влияния TDP-43 на параспеклы. А именно, снижение уровня TDP-43 приводило к избыточному накоплению двухцепочечной РНК в клетке, что в свою очередь запускало реакцию схожую с ответом на вирусную инфекцию – синтез интерферонов I типа, что в свою очередь усиливало образование параспеклов. Важный вопрос, который ставит перед собой автор – это каково же значение параспеклов для нервных клеток. Измерение экспрессии проапоптотических маркеров позволило заключить, что параспеклы играют защитную роль.

Второй раздел результатов посвящен характеристике линии мышей с инактивированным геном *Neat1*. Диссертант отмечает, что, хотя эта линия мышей была создана ранее другими авторами и охарактеризована как не имеющая фенотипа, внимательный подход к анализу поведения позволил выявить целый комплекс признаков, говорящих о нарушении в работе нервной системы. Примечательно, что наиболее выделяющиеся отклонения от нормы наблюдались в условиях, которые могут быть охарактеризованы как стрессовые для мышей. Так в условиях яркой освещенности

и новизны обстановки нокаутные мыши демонстрировали гиперактивность, тогда как при социальном контакте с особями, проявляющими агрессию мыши, лишённые Neat1 вели себя крайне пассивно. Эти и другие результаты указывают на наличие серьёзных психических отклонений, проявляющихся только в стрессовых условиях у мышей с нарушенной функцией Neat1. Интересно отметить, что никаких признаков нейродегенерации у таких мышей обнаружено не было. В то же время электрофизиологические исследования, проведенные на первичных нейронах, показали, что отсутствие Neat1 приводит к гиперактивности клеток. Транскриптомный анализ коры головного мозга нокаутных животных выявил незначительные изменения в профиле экспрессии генома. Более значимые с точки зрения интерпретации результаты были получены при анализе альтернативного сплайсинга. Был выявлен целый ряд генов, связанных с поддержанием нейронального гомеостаза, альтернативный сплайсинг которых был изменен. Многие из них оказались генетически ассоциированными с психическими расстройствами у человека. Подводя итог этой части работы, можно сказать, что были охарактеризованы интересные аспекты функционирования длинной некодирующей РНК Neat1, которая, по-видимому, играет регуляторную роль в процессах, связанных с адаптацией нервной системы к стрессовым условиям. В то же время остается вопрос о связи наблюдаемых нарушений в поведении нокаутных мышей с патологией БАС.

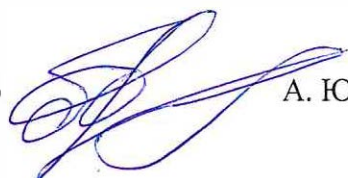
В заключительном разделе результатов приводится характеристика белка CREST. Отталкиваясь от его генетической ассоциации с БАС, автор решает провести подробное изучение агрегационных свойств этого белка, оценить влияние различных мутаций на этот процесс, а также проверить его вовлеченность в образование РНП комплексов. Во-первых, была продемонстрирована повышенная склонность CREST к образованию внутриядерных и цитоплазматических агрегатов, даже тогда, когда мутации в последовательности белка отсутствовали. Во-вторых, в условиях химически индуцированного стресса CREST перераспределялся в цитоплазматические РНП комплексы – стресс-гранулы. Однако агрегированные формы CREST не колокализировались со стресс-гранулами. CREST не обнаруживался в параспеклах, в то же время при агрегации он через захват белков компонентов параспеклов приводил к снижению способности клеток образовывать параспеклы. В-третьих, мутантные варианты CREST и даже нормальный белок, но при повышении его концентрации в клетках, оказывал токсический эффект на первичные нейроны, что проявлялось в угнетении роста нейритов. Интересно, что в отличие от других белков, вовлекаемых в стресс-гранулы и связанных с БАС, CREST не является ДНК/РНК связывающим белком. Это подтверждает точку зрения о том, что нарушения, приводящие к развитию БАС, не ограничиваются функционально-узкими классами белков, а скорее связаны с белками или даже РНК, которые можно объединить в группу молекул, участвующих в образовании РНП комплексов, как ядерных, так и цитоплазматических и прежде всего связанных с адаптацией клеток к стрессовым условиям.

Заключение

Диссертационная работа Кухарского Михаила Сергеевича «Нарушение функций рибонуклеопротеиновых комплексов в патогенезе бокового амиотрофического склероза» представляет собой самостоятельное и законченное исследование, включающее обширный материал по новым аспектам патогенеза бокового амиотрофического склероза. Результаты работы представляют большой научный интерес и формируют новое направление исследований роли рибонуклеопротеиновых комплексов и входящих в их состав белков и РНК в функционировании нервной системы в норме и при развитии патологических состояний.

Диссертация удовлетворяет всем требованиям пункта 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 года (в редакции Постановления Правительства Российской Федерации №1168 от 01 октября 2018 г.) предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а ее автор Кухарский Михаил Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Официальный оппонент,
доктор биологических наук по специальности
03.01.02 – Биофизика, заведующий лабораторией
клеточной физиологии и патологии федерального
государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования «Орловский
государственный университет имени И. С. Тургенева»
Телефон: +7 (4862) 41-98-02
E-mail: andrey_abramov@mail.ru



А. Ю. Абрамов

Подпись А. Ю. Абрамова заверяю:

«6» сентября 2021 г.



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева», <http://oreluniver.ru/>
302026, Россия, Орловская обл., г. Орел, ул. Комсомольская, 95
Тел. +7 (4862) 751-318
info@oreluniver.ru