

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук, профессора, заведующего кафедрой биохимии медико-биологического факультета ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Мошковского Сергея Александровича на диссертацию Екатерины Андреевны Лысиковой «Новая модель фронто-темпоральной деменции на трансгенных мышах с медленно прогрессирующей FUS-протеинопатией», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 14.03.03 – патологическая физиология и 03.01.04 – биохимия

Актуальность темы выполненного исследования.

Диссертационная работа Е.А. Лысиковой посвящена фундаментальной проблеме биологии – созданию модельных животных, воспроизводящих основные звенья патогенеза нейродегенеративных заболеваний, в основе развития которых лежит образование в клетках нервной системы нерастворимых белковых агрегатов и обозначаемых общим термином «протеинопатии». В рамках этой общей проблемы особое место занимает исследование нарушений метаболизма РНК/ДНК-связывающего белка FUS, который участвует в процессах трансляции и последующем сплайсинге молекул РНК. Мутации в гене FUS связаны с развитием таких заболеваний, как боковой амиотрофический склероз (БАС) и фронто-темпоральная дегенерация (ФТД). На сегодняшний день существует гипотеза о том, что в основе развития указанных протеинопатий лежит схожий молекулярно-генетический механизм агрегации белка. Согласно этой гипотезе, БАС и ФТД представляют два различных фенотипических проявления одного молекулярного патологического процесса. БАС и ФТД различаются локализацией этого процесса: при БАС поражаются мотонейроны в спинном и головном мозге, что приводит к быстро прогрессирующей мышечной дегенерации и тяжелой инвалидизации больных, скорой прогрессии заболевания (в среднем 3-5 лет) и летальному исходу. При ФТД преимущественно поражаются нейроны лобных или височных долей головного мозга, что приводит к медленному ухудшению когнитивных функций пациентов и изменению их социального поведения.

Таким образом, актуальность изучения патогенеза данных заболеваний обусловлена широким интервалом дебюта начала заболевания, неизбежной

инвалидизацией больных и отсутствием действенной терапии. Несмотря на социальную значимость этих патологических состояний на сегодняшний день отсутствует действенная терапия данных протеинопатий.

Диссертация Е.А. Лысиковой посвящена описанию трансгенных животных линии L-FUS[1-359] как модели ФТД. Животные данной линии были получены в серии обратных скрещиваний на генетическом фоне CD1 из линии трансгенных мышей tg_hFUS[1-359] с эктопной экспрессией патогенной формы белка FUS человека и воспроизводящих фенотип БАС. Полученная линия L-FUS[1-359] отличается от оригинальной линии сниженным уровнем экспрессии патогенной формы белка FUS человека в нервной системе. Это привело к инвертированию фенотипа с БАС на ФТД и медленную прогрессию FUS-протеинопатии без селективной гибели мотонейронов. Проведенный сравнительный анализ транскриптомов спинного мозга у животных L-FUS[1-359] в сравнении с животными дикого типа выявил группы генов с измененной экспрессией, что может быть использовано для решения исключительно актуальной задачи: определения молекулярных мишеней при создании патогенетической терапии БАС и ФТД.

Научная новизна полученных результатов.

Для определения влияния низких уровней экспрессии патогенной формы белка FUS на клетку была получена и охарактеризована линия животных L-FUS[1-359]. В геноме таких мышей экспрессируется трансгенная кассета, кодирующая укороченную форму белка FUS человека с удаленными доменом сигнала ядерного транспорта на С-конце молекулы, что увеличивает ее агрегационные свойства. У животных оригинальной линии tg_hFUS[1-359], в геноме экспрессируется эта же трансгенная кассета, но на более высоком уровне, что приводит у них к развитию фенотипа БАС уже в раннем возрасте.

Автором впервые охарактеризована линия трансгенных мышей L-FUS[1-359] как модель фронтотемпоральной деменции. Использование методов классических поведенческих тестов для анализа когнитивной функции стареющих L-FUS[1-359] мышей позволило выявить изменения, включающие снижение тревожного состояния, увеличение импульсивности, нарушения формирования и угасания

долговременной памяти, а так же снижение социальных взаимодействий, которые характерны для больных с ФТД.

В работе впервые показано, что у животных L-FUS[1-359] даже с возрастом не развиваются клинические и гистопатологические симптомы дегенерации моторных нейронов. Тогда как при патогистологическом анализе тканей пациентов с БАС в цитоплазме и ядре клеток обнаруживаются крупные белковые включения белка FUS, у животных L-FUS[1-359] небольшие скопления белка диффузно распределены в цитоплазме клетки. Такие результаты могут служить основой для выдвижения гипотезы о том, что при низком уровне экспрессии патогенной формы белка FUS в клетках нервной системы могут активироваться собственные защитные механизмы, препятствующие развитию нейродегенеративного процесса.

Для установления генов, которые могут быть вовлечены в клеточные механизмы компенсации впервые был проведен анализ транскриптомов спинного мозга у животных L-FUS[1-359] в сравнении с контролями дикого типа. В результате анализа были выявлены дифференциально-экспрессирующиеся гены, среди которых наибольшая группа с повышенной экспрессией- это белки, вовлеченные в процессы клеточной адгезии и формирование внеклеточного матрикса. Кроме того, было отмечено повышение уровней экспрессии генов, вовлеченных в механизмы отрицательной регуляции нейрональной дифференцировки и снижение экспрессии генов, кодирующих белки семейства шаперонов и шаперонинов. Были также выявлены различия в группах генов, вовлеченных в регуляцию циркадных ритмов.

Возможно, что изменение экспрессии некоторых из этих групп белков отражает активацию клеточных компенсаторных механизмов против патогенной формы белка FUS. Дальнейшие исследования данных групп генов может выявить механизм и молекулярные мишени при разработке патогенетической терапии FUS-протеинопатий.

Степень достоверности результатов и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.

Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций работы не вызывает сомнений и подтверждается достаточным объемом набранного

материала. При проведении исследования был грамотно составлен план работы, сформулированные задачи полностью соответствуют цели работы и для ее достижения использовались современные методы: методом ПЦР в реальном времени осуществлялось определение присутствия трансгенной кассеты в геноме и определение числа встроенных копий, качественное определение присутствия белка FUS в тканях методом иммуноблоттинга, анализ локализации и морфологии белковых агрегатов выполняли методом иммуногистохимии. Исследование когнитивных функций животных проводилось в батарее поведенческих тестов на выборке трансгенных животных и контролей дикого типа из 12 особей каждого генотипа. Для определения места встраивания трансгена в геном животных использовали метод *in situ* гибридизации метафазных лейкоцитов трансгенных животных с пробой, содержащей меченую последовательность белка FUS человека под контролем пан-нейронального промотора Thy-1. Определение белков с измененной экспрессией в двигательных нейронах спинного мозга трансгенных животных L-FUS[1-359] проводили методом секвенирования РНК.

Структура и содержание диссертации.

Диссертация Е.А. Лысиковой оформлена в соответствии с требованиями ВАК и имеет общепринятую структуру, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка условных сокращений и списка литературы. Работа изложена на 136 страницах машинописного текста, содержит 2 таблицы и 25 рисунков. Библиографический указатель содержит 253 источника, из которых 16 российские и 237 зарубежные. Содержание работы соответствует специальностям 14.03.03 – патологическая физиология и 03.01.04 – биохимия.

В разделе «Введение» сформулированы актуальность, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология исследования, положения, выносимые на защиту и личный вклад автора.

Глава «Обзор литературы» занимает 39 страниц и дает возможность ознакомиться с современными гипотезами об этиологии и патогенезе протеинопатий и генетическими аспектами создания трансгенных животных, моделирующих БАС и ФТД.

Глава, посвященная материалам и методам исследования содержит полное описание использованных в исследовании методов анализа. Выбор материалов и методов исследования соответствует поставленной цели и задачам исследования. Методы соответствуют современному уровню развития науки.

Глава «Результаты исследования и их обсуждение» включает анализ данных основных методов исследования. Данные, представленные на рисунках, наглядно отображают основные результаты исследования. Представлены результаты сравнительного анализа числа встроенных копий трансгенной кассеты, места встраивания трансгена и уровня его экспрессии у животных линий L-FUS[1-359] и tg_hFUS[1-359]. Проведенный гистологический анализ позволил охарактеризовать различия в морфологии белковых агрегатов аберрантной формы FUS у животных двух линий. Результаты проведенных поведенческих тестов на животных L-FUS[1-359] в возрасте 5 месяцев в сравнении с контрольными животными дикого типа выявили ряд нарушений когнитивных и поведенческих функций, повторяющих основные симптомы ФТД, что дает основание рассматривать линию L-FUS[1-359] в качестве модели данного заболевания.

Выводы соответствуют поставленным целям и задачам исследования и полученным результатам.

Сведения о полноте опубликованных научных результатов.

Основные результаты диссертационной работы Е.А. Лысиковой представлены в виде 15 печатных работ, среди которых в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах (2 статьи в рецензируемых иностранных журналах и 1 статья в рецензируемом журнале из перечня рецензируемых научных изданий ВАК РФ) и 12 тезисов в сборниках докладов российских и международных научных конференций.

Автореферат отражает основные положения диссертации.

Замечания к диссертации

При положительной оценке работы к ней могут быть высказаны замечания. Все молекулярно-биологические работы, манипуляции с животными, получение данных поведенческих тестов и их интерпретация не вызывает существенных нареканий. Часть, касающаяся анализа транскриптомов, описана несколько

небрежно, с элементами неясности изложения. Рисунок 24, на котором показаны дифференциально экспрессированные гены разных категорий, достаточно скупо интерпретирован. На нем, в частности не показана степень обогащения списка белков категориями Gene Ontology. Одно дело, если результат слегка превосходит пороговое значение p -value (заданное на достаточно высоком уровне 0,05), а другое – когда достигается значительное превышение. Таким образом, достоверные отличия по категориям в представленных результатах не снабжаются понятием амплитуды наблюдаемого эффекта.

Далее, при описании результатов экспериментов автор ограничился простым перечислением разных групп дифференциально экспрессирующихся генов. Более глубокая интерпретация изменений экспрессии не проведена (правда, не факт, что она возможна).

Не очень хорошо обоснован выбор генов, изменение экспрессии которых проверяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (их выбрано 5 из более 200 дифференциально экспрессированных генов из анализа транскриптома).

Вместе с тем, отмечу, что недоработки касаются малой, не самой значительной частью диссертации. Замечания не несут принципиального характера и не влияют на положительную оценку диссертации.

Заключение.

Таким образом, диссертационная работа Е.А. Лысиковой «Новая модель фронто-темпоральной деменции на трансгенных мышах с медленно прогрессирующей FUS-протеинопатией» является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи – создание трансгенной модели фронто-темпоральной деменции на основе линии мышей с нейроспецифической экспрессией патогенной формы белка FUS человека и определение групп дифференциально-экспрессируемых генов, задействованных в механизмах, обеспечивающих подавление FUS-протеинопатии в нейронах спинного мозга трансгенных животных. Результаты диссертационной работы имеют существенное значение для биомедицинской науки.

Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г. в редакции постановления Правительства РФ от 28.08.2017г. №1024, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальностям 14.03.03 – патологическая физиология и 03.01.04 – биохимия.

Официальный оппонент

Зав. кафедрой биохимии медико-биологического факультета
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России, профессор РАН,
доктор биологических наук
по специальности 03.01.04 – биохимия

Мошковский Сергей Александрович

Подпись зав. кафедрой биохимии медико-биологического факультета, д.б.н.
Мошковского Сергея Александровича заверяю

Ученый секретарь ФГАОУ ВО РНИМУ
им. Н.И. Пирогова Минздрава России.
д.м.н., доцент
«10» 02 2020



Милушкина Ольга Юрьевна

Сведения об авторе отзыва:

ФИО: Мошковский Сергей Александрович **Телефон:** +7 (903) 101-86-54

e-mail: smosh@mail.ru

ученая степень: доктор биологических наук

по специальности: 03.01.04 - биохимия

Место работы, занимаемая должность: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой биохимии медико-биологического факультета

Адрес: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д.1