



«УТВЕРЖДАЮ»
Директор Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института
молекулярной генетики РАН,
Член-корреспондент РАН
Костров Сергей Викторович

2 февраля 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной генетики Российской академии наук –
о диссертационной работе **Д. И. Родина** на тему
**«ЭФФЕКТЫ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА БЕЛКА ПРЕДШЕСТВЕННИКА
АМИЛОИДА В НЕРВНЫХ КЛЕТКАХ ДРОЗОФИЛЫ И ПОИСК
АНТИАМИЛОИДОГЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ»**,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.07 - генетика

Актуальность исследования

Снижение смертности и продление здоровой человеческой жизни являются одним из приоритетных направлений работы в биологии и медицине. Известно, что старение сопряжено с развитием различных нейродегенеративных заболеваний и старческих деменций, и, следовательно, предупреждение и лечение этих заболеваний, замедление старения и продление жизни могут быть связаны с коррекцией одних и тех же метаболических путей и вызваны вмешательством одних и тех же агентов. Исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе развития нейродегенеративных заболеваний, является актуальной задачей, решение которой необходимо для их эффективного лечения, основанного на использовании лекарственных препаратов нового поколения, и улучшения качества жизни в пожилом возрасте.

Наиболее распространенной старческой деменцией является болезнь Альцгеймера (БА), характерными паталогическими маркерами которой являются деграция тканей мозга, присутствие в них нейрофибриллярных клубков, образованных гиперфосфорилированным белком тау, и амилоидных бляшек, включающих агрегированный амилоид-бета (А β) пептид. А β является продуктом протеолиза белка-предшественника амилоида (APP), крупного трансмембранного белка, который присутствует в синапсах нейронов. Функции этого белка до конца неясны, хотя известен целый ряд различных процессов, в которых он принимает участие. Диссертационная работа Д. И. Родина в значительной степени восполняет существующие пробелы в знании и потому, безусловно, важна и востребована. Значение всестороннего исследования функциональной роли APP обусловлено еще и тем, что на разных стадиях развития, в разном возрасте, в разных тканях изменение его работы может иметь разное значение для организма. Понимание всего комплекса последствий, вызванных изменением активности APP, необходимо для того, чтобы корректировать связанные с ним патологии.

В последние годы для исследования молекулярно-генетических основ различных патологий всё большее использование находят модели болезней человека, созданные с использованием *Drosophila melanogaster*. Наибольший успех достигнут в создании моделей различных нейродегенеративных заболеваний, что обусловлено принципиальным сходством в развитии и структуре нейронов и системах передачи нервного импульса у дрозофилы и человека, а также возможностью адекватной оценки изменений в поведении и долгосрочной и краткосрочной памяти. Как модельный организм дрозофила имеет

множество преимуществ, например, наиболее изощренный по сравнению с другими модельными организмами генетический инструментарий. В распоряжении исследователей находятся мутации практически всех генов, работа около 80% генов может быть заблокирована с помощью РНК-интерференции, усилена или ослаблена в целой мухе и в отдельном органе или ткани благодаря использованию специальных коллекций линий. Этот современный инструментарий был умело использован Д. И. Родиным при выполнении диссертационной работы.

Научная новизна исследования, достоверность и обоснованность научных результатов

Научная проблема, исследованию которой посвящена диссертационная работа Д. И. Родина, лежит на стыке нескольких областей науки: генетики, биологии развития, медицинской генетики, фармакологии. Для разработки этой проблемы автор работы были выбраны современные генетические подходы и методы, что позволило получить новые, оригинальные данные, свидетельствующие о роли APP в процессе развития дрозофилы и о его влиянии на транскрипционную активность генов ряда пресинаптических белков. В работе также было впервые выявлено влияние потребления дрожжей-продуцентов красного пигмента на содержание растворимой и нерастворимой фракции A β ₄₂, а также на когнитивные функции мух со сверхэкспрессией A β ₄₂.

Диссертация построена по стандартному плану. Во Введении традиционно изложено современное состояние той области науки, в которой работает автор, описаны проблемы, заслуживающие дальнейшего изучения, поставлены цели и задачи конкретного исследования, представленного в диссертационной работе, сформулированы основные положения, выносимые на защиту по результатам работы автора.

Обзор литературы, составляющий примерно треть диссертации, написан очень толково и представляет собой систематизированную сводку данных, касающихся БА: ее признаков, форм, генетических и эпигенетических факторов, влияющих на нее, методов лечения. Хорошо продуманная разбивка на главы облегчает восприятие материала и делает более ясным место проведенной автором работы в общем спектре работ в данной области науки. В обзоре не только рассмотрены различные гены, влияющие на возникновение и развитие БА, но и систематизированы сведения о мутациях в гене, кодирующем APP, в том числе охарактеризована использованная в экспериментальной части работы мутация *Swedish*. Автор уделяет существенное внимание рассмотрению биогенеза и функций двух основных соединений, роль которых исследована в диссертации: APP и A β . Рассмотрение роли эпигенетических модификаций в генезисе БА обосновывает собственные экспериментальные исследования автора, свидетельствующие о значении метилирования промоторных областей генов в реализации эффектов APP. Поскольку существенная часть экспериментов, вошедших в диссертацию Д. И. Родина, посвящена анализу влияния синтезируемого дрожжами красного пигмента на молекулярные симптомы БА, автор уделил большое внимание рассмотрению лекарственных препаратов, предназначенных для лечения БА. Соответствующая глава Обзора весьма информативна и представляет как сводку уже имеющихся лекарств, так и перспективные направления их разработки. Автор упомянул и препараты, протестированные в лаборатории, где он выполнял диссертационную работу, однако в этом случае не привел ни одной ссылки. Последняя глава Обзора посвящена моделированию БА у мыши и дрозофилы; автор приводит убедительные аргументы в пользу исследования болезней человека на основе модельных животных.

Раздел «Материалы и методы» содержит достаточно подробное описание использованных методов и подходов. Производит впечатление разнообразие методов, освоенных и использованных автором в ходе выполнения работы. Такой комплексный подход к

решению поставленных задач, безусловно, заслуживает высокой оценки. В части 2.1 этого раздела стоило бы привести полные генотипы использованных линий дрозофилы – ведь диссертация защищается по специальности «генетика», и генетически грамотное представление линий подчеркнуло бы профессионализм соискателя. Стоило бы также включить в эту часть более подробное описание принципа действия бинарной GAL4-UAS системы для того, чтобы он был понятен тем, кто не является узким специалистом в области генетики дрозофилы. А вот рисунок 4 – это удачная находка автора, существенно облегчающая восприятие характеристик использованных линий. В частях 2.2, 2.3, 2.4 стоило бы указать выборки для разных вариантов опытов. В части 2.7 подробно описан метод обратной ПЦР в реальном времени – такое описание позволяет судить о хорошем уровне методической грамотности соискателя. Правда, и в этом, и в следующем разделе стоило бы указать, сколько транскриптов образуют исследуемые гены, и если транскриптов несколько, то количество и регуляторные зоны каких именно транскриптов были исследованы.

Результаты и обсуждение работы изложены в четырех главах. В части 3.1.1 рассмотрено влияние сверхэкспрессии нормального и мутантного гена APP человека, одного или в сочетании со сверхэкспрессией гена BACE человека, на выживание особей на стадии куколка-имаго. Следовало бы указать в этой части или в части 2.1 Материалов и Методов, как получали особей, совместно экспрессирующих APP и BACE. В частях 3.1.2 и 3.1.2 рассмотрено влияние сверхэкспрессии нормального и мутантного гена APP человека, одного или в сочетании со сверхэкспрессией гена BACE человека, на образование морфозов. Изложение результатов представляется несколько сумбурным и вызывает ряд вопросов. Во-первых, нет данных о частоте морфозов у контрольных особей. Очевидно, что она существенно меньше, чем у опытных мух, и автор, видимо, считает ее равной нулю. Однако, скорее всего, и у контрольных особей морфозы иногда возникают. Во-вторых, непонятно, почему в общем контексте работы было решено исследовать роль мелассы в возникновении морфозов. Анализ роли калорийности диеты не был заявлен в качестве задачи работы. В-третьих, на стр. 60 отмечено, что экспрессии «последовательности, кодирующей A β ₄₂ в мозге трансгенных особей *Drosophila* не приводила к описанным выше дефектам развития. Изучение трансгенных линий мух, несущих ген другого крупного трансмембранного белка человека *PSEN-1* или ген *BACE* также не выявило морфологических отклонений в развитии *Drosophila*». Непонятно, откуда взяты эти утверждения – они не основаны на результатах автора диссертации и не подкреплены ссылками. Однако в целом представленные данные представляют большой интерес, так как свидетельствуют о роли APP, независимо от образования A β , в контроле жизнеспособности, развития и морфогенеза дрозофилы. Следует отметить, что выводы работы, сделанные на основе полученных результатов, абсолютно корректны и не содержат упомянутых выше недоказанных положений, использованных в обсуждении. Стоит добавить также, что обсуждение результатов, представленных в этой главе, весьма интересно и содержательно. Автор рассматривает три возможных механизма возникновения морфозов (аномалий развития), связанных со сверхэкспрессией APP. На основе обсуждения Д. И. Родиной предполагается, что «нарушение нормальных функций белка APP ведет к активации иммунного ответа и соответствующей воспалительной реакции ...», однако выносить это положение на защиту вряд ли стоило, поскольку оно не подкреплено собственными данными.

Очень интересные данные получены Д. И. Родиной при изучении влияния APP на транскрипцию пресинаптических белков (главы 3.2 и 3.3). Прежде всего, поставленные задачи очень хорошо обоснованы ранее полученными данными об изменении синаптической плотности и количества пресинаптических белков у особей со сверхэкспрессией APP. Автор делает успешную попытку выявить механизм этих изменений и показывает, что транскрипция генов, кодирующих пресинаптические белки

синаптогамин и синаптобревин, снижена у мух как в раннем, так и в среднем возрасте. Д. И. Родину удается продемонстрировать специфичность такого эффекта гиперэкспрессии *APP* в мозге дрозофилы. Такая специфичность указывает на многообразие процессов, ведущих к нейродегенеративным изменениям. Представлены также данные, указывающие на возможную роль метилирования промоторной области гена, кодирующего пресинаптический белок синаптогамин, в контроле уровня его транскрипции при сверхэкспрессии *APP*. Полученные данные позволяют автору прийти к принципиально важному заключению о том, что нарушения процессов транскрипции генов синаптических белков могут лежать в основе изменения синаптической плотности, наблюдаемой при БА и являются одним из ранних признаков заболевания.

Наконец, в главе 3.4 представлены данные о влиянии содержания взрослых мух с экспрессией последовательности, кодирующей пептид $A\beta_{42}$, на среде с дрожжами-продуцентами красного пигмента на амилоидогенез и нейродегенеративные процессы. Очень изящно и убедительно, с привлечением разных методов оценки и разных контролей, Д. И. Родину удалось продемонстрировать влияние красного пигмента на количество $A\beta_{42}$ в мозге мух. Снижение количества $A\beta_{42}$ сопровождалось также позитивными эффектами в отношении нейродегенерации, подвижности и когнитивных свойств. Эта часть диссертационной работы представляет самостоятельный интерес и заслуживает дальнейшего развития в прикладном направлении.

Хотелось бы отметить, что диссертация в целом написана ясно, логично, хорошим языком, удачно иллюстрирована таблицами и рисунками. Это не исключает, конечно, присутствия отдельных погрешностей. Приведу несколько примеров. Список сокращений содержит разговорное слово «дрозофильный»; сокращения расшифровываются в некоторых случаях точно, словами на английском языке, а в некоторых случаях по-русски – думаю, стоило бы во всех случаях привести исходную точную расшифровку, а затем перевод на русский язык. Во всех опытах сравниваются не линии, как в большинстве случаев пишет автор, а особи с определенными генотипами, полученные в результате скрещиваний. На рисунке 16 все панели подписаны одинаково в отношении использованного референсного гена, в то время как две нижние панели, скорее всего, должны представлять данные для второго референсного гена.

Заключение о научно-практической ценности работы и соответствии её требованиям ВАК

Диссертационная работа Д. И. Родина является законченным, актуальным, оригинальным, выполненным на высоком научном и методическом уровне исследованием. Высказанные в отзыве критические замечания не снижают качество работы в целом. Работа имеет большую научную ценность: полученные результаты проливают новый свет на механизмы развития организма, функции и патологии нервной системы. Результаты работы могут быть использованы в образовательных курсах по генетике и нейробиологии, а также в научно-исследовательской работе Институтов и Университетов биологического и медицинского профиля. Работа имеет большую практическую перспективу. Изменение транскрипции пресинаптических генов можно рассматривать в плане использования для практических целей ранней диагностики БА. Результаты, касающиеся влияния красного пигмента дрожжей на снижение количества амилоида и уровня нейродегенерации, восстановление подвижности и когнитивных свойств, представляются весьма перспективными в плане дальнейшей разработки практического использования красного пигмента для лечения БА.

Выводы работы адекватны полученным результатам, опубликованным в журналах из списка ВАК и представленным на различных научных конференциях. Содержание Автореферата хорошо соответствует содержанию диссертации. Тематика диссертации

полностью соответствует специальности 03.02.07 – генетика. В целом работа соответствует требованиям ВАК и Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. N 842 «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Д. И. Родин, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени.

Отзыв рассмотрен и одобрен на научном семинаре Отдела молекулярной генетики клетки ИМГ РАН 21 января 2015 года (протокол № 1).

Заведующий лабораторией геномной изменчивости
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной генетики РАН
(Москва, пл. Академика И. В. Курчатова, д. 2; +7-499-1960000; ing@img.ras.ru),
доктор биологических наук, профессор

Пасюкова Елена Генриховна

Подпись Е. Г. Пасюковой заверяю

Ученый секретарь
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной генетики РАН,
кандидат биологических наук



Андреева Людмила Евгеньевна