

ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИЦиГ СО РАН)

Просп. Академика Лаврентьевса, д. 10, Новосибирск, 630090
Телефон: (383) 363-49-80
Факс (383) 333-12-78
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru
<http://www.bionet.nsc.ru>
ИНН 5408100138/КПП 540801001
ОКПО 03533895 ОГРН 1025403657410

От 24.04.2015 № 15345-25-2141

На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»



и.о. директора ИЦиГ СО РАН

д.б.н. А.В. Кочетов

24 апреля 2015 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Никитиной Екатерины Александровны
«Физиолого-генетический анализ механизмов патогенеза нейродегенеративных
заболеваний с привлечением моделей на дрозофиле», представленную на
соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям

03.03.01 – физиология и 03.02.07 – генетика

Диссертационная работа Е.А. Никитиной посвящена изучению факторов и механизмов, влияющих на развитие нейродегенеративных заболеваний (на модели *Drosophila melanogaster*), что относится к одной из актуальнейших тем современной генетики и физиологии.

Актуальность темы исследования, обоснованность и достоверность результатов

В диссертации поставлена задача проведения комплексного физиолого-генетического анализа когнитивных и моторных нарушений у ряда мутантных и трансгенных линий *D. melanogaster*, представляющих собой экспериментальные модели нейродегенеративных заболеваний человека, а также выявления

молекулярных механизмов этих нарушений. Актуальность данного направления обусловлена необходимостью глубокого понимания процессов, лежащих в основе патогенеза нейродегенеративных заболеваний, необходимого для разработки новых методов лечения и диагностики. Высокая скорость и широкий спектр доступных методов исследований на дрозофиле, в сочетании с высокой консервативностью (70% гомологии между дрозофилой и человеком) локусов, связанных с развитием нейродегенеративных заболеваний, делает использование дрозофилы в качестве модельного объекта для их изучения весьма перспективным. Использованные в работе мутации и генетические конструкции *D. melanogaster* воспроизводят все основные диагностические признаки нейродегенеративных заболеваний человека: нарушение памяти, моторную дисфункцию и образование белковых агрегатов. Моделирование этих признаков на животных моделях необходимо по причине затрудненности диагностики в этой области медицины.

В работе Е.А. Никитиной рассмотрены задачи выяснения особенностей двигательной активности и формирования памяти у *D. melanogaster* под влиянием мутаций генов, регулирующих функциональные процессы мозга, и нейротрофических факторов человека, введенных при помощи трансгенеза. Изучение механизмов участия таких генов в реализации и контроле моторных и когнитивных функций у модельного объекта способствует выявлению ключевых генов и генов-модификаторов нейродегенеративных заболеваний человека, что в перспективе может служить для идентификации индивидуумов с высокой степенью риска развития тех или иных конкретных заболеваний из данной группы, и, следовательно, для развития предиктивной медицины.

Другая актуальная задача диссертации – изучение роли сигнального каскада ремоделирования актина в регуляции функциональных процессов мозга. Нейродегенеративные заболевания относят к болезням цитоскелета – кофилинопатиям, поскольку для них свойственно образование кофилин-актиновых комплексов в нейронах. Использование дрозофилы для исследования механизмов функционирования данного каскада (рецепторы

нейротрансмиттеров — малые ГТФазы Rho-семейства — LIM киназа 1 — кофилин — актин), а также поиска способов влияния на его работу является важной научно-практической задачей.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

В работе Е.А. Никитиной впервые использован комплексный подход к изучению признаков нейродегенеративных заболеваний у модельных животных, сочетающий методы анализа формирования памяти и локомоторной активности, имmunогистохимический анализ распределения компонентов каскада ремоделирования актина в различных органах дрозофилы, молекулярно-генетические и биоинформационные методы анализа генетических и эпигенетических факторов, влияющих на развитие «нейродегенеративного» фенотипа.

Полученные данные о двигательной активности, способности к обучению и формированию среднесрочной и долгосрочной памяти у мутантных линий дрозофилы с нарушениями в генах, регулирующих функциональные процессы мозга, являются новыми и оригинальными.

Обнаружено нарушение памяти у особей дрозофилы с дефектом синтеза белков теплового шока, что свидетельствует о вовлеченности последних в механизмы регуляции мозговой активности.

В диссертации впервые получены данные о вовлеченности глии в функционирование сигнального каскада ремоделирования актина: обнаружена вненейрональная локализация р-кофилина в области нейромышечных контактов дрозофилы.

Впервые показано влияние изменений в структурных и регуляторных участках гена LIM киназы 1, *limk1*, в контроле моторных и когнитивных функций.

Выявлены новые механизмы эпигенетической регуляции гена *limk1*.

Значимость полученных соискателем результатов для науки и практической деятельности

Теоретическая значимость работы связана, в первую очередь, с расширением современных представлений о механизмах нейродегенерации. Предложен новый подход к анализу диагностических признаков нейродегенеративных заболеваний с использованием дрозофилы в качестве модели для изучения генеза нейропатологии, что имеет важное фундаментальное и прикладное значение. Выявлена роль микроРНК как одного из ведущих факторов эпигенетической регуляции развития нейропатологии.

Полученные результаты также способствуют развитию понимания характера взаимодействий между генными сетями, задействованными в регуляции функциональных процессов мозга в норме и при патологии.

Практическая ценность работы состоит в разработке методов, позволяющих использовать модельный объект (дрозофилу) для подбора лекарственных препаратов, способных корректировать симптомы нейродегенеративных заболеваний.

Результаты, полученные в диссертации, могут быть включены в курсы лекций по ряду биологических дисциплин, в том числе по физиологии и молекулярной генетике.

Структура и содержание работы

Диссертация построена по классическому образцу: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, общее обсуждение, заключение, выводы и список литературы из 820 наименований. Работа изложена на 460 страницах и содержит 150 рисунков и 26 таблиц.

Обзор литературы содержит информацию о современном состоянии медицинской науки в области изучения нейродегенеративных заболеваний (с упором на причины их возникновения). Также в каждой главе обзора литературы представлены данные по использованию *D. melanogaster* в качестве модели для изучения тех или иных нарушений мозговой активности,

приводящих у человека к развитию нейродегенеративных заболеваний. Достаточно подробно описаны устройство и функционирование ЦНС *D. melanogaster*, генетические основы процессов обучения, памяти и локомоторной активности у этого объекта, а также – роль LIM-киназы 1 и микроРНК в контроле этих процессов. Отдельная глава обзора посвящена изучению нейротрофических факторов мозга человека и возможности их использования в терапии нейродегенеративных заболеваний.

Раздел «**Материалы и методы**» содержит подробное описание линий дрозофилы, использованных в исследовании, а также предоставляет исчерпывающую информацию по дизайну проведенных экспериментов и методам компьютерного анализа, использовавшимся в работе.

В главе «**Результаты**» подробно изложены данные собственных исследований автора. Ею проведен анализ когнитивного поведения у линий дрозофилы дикого типа и несущих мутации в генах путей ремоделирования актина (*agnostic*), кинуренинового обмена триптофана (*cardinal*, *vermillion* и *cinnabar*) и теплового шока (*ts403*), или трансгенные конструкции генов некодирующих РНК и нейротрофических факторов мозга человека под hs-промотором. Наиболее выраженные нарушения памяти и звукопродукции обнаружены для мутантов по локусу *agnostic*, что свидетельствует о ключевой роли гена LIM-киназы 1 (*limk1*) в регуляции поведения со стороны как центральной, так и периферической НС. Показано, что дисбаланс кинуренинов также приводит к нарушениям памяти и звукопродукции. У мутантов *agn^{ts3}* и *cardinal* обнаружены амилоидные включения в структурах НС. Интересен тот факт, что нарушение среднесрочной памяти наблюдалось и при дефекте синтеза белков теплового шока, а активация гена глиального нейротрофического фактора человека при действии теплового шока восстанавливала характеристики среднесрочной памяти до уровня, характерного для дикого типа.

Данные изучения двигательной активности *D. melanogaster*, полученные автором, свидетельствуют что как нарушения в структуре гена *limk1*, так и дисбаланс кинуренинов вызывают нарушения локомоторной активности.

Е.А. Никитиной также изучена экспрессия генов сигнального каскада ремоделирования актина и их локализация в мозге и нейромышечных контактах дрозофилы в нормальных условиях и при тепловом стрессе, проведены секвенирование гена *limk1* и анализ модификаций в его структурной и регуляторной областях у мутанта *agn^{ts3}* по сравнению с последовательностями гена *limk1* линий дикого типа *CS*, *Berlin* и *Or-R* и последовательностью в базе данных *flybase.org*. Проведен компьютерный поиск сайтов связывания микроРНК *D. melanogaster* с участками *limk1*, несущими протяженные вставки и делеции у полиморфных линий, и показано, что мутации в гене *limk1* у *agn^{ts3}* изменяют сайты гомологии с микроРНК, создавая новые по сравнению с диким типом.

В «Общем обсуждении результатов» автор анализирует полученные результаты с привлечением широкого спектра данных литературы, рассматривает взаимодействия между различными генными сетями, участвующими в регуляции мозговых функций в норме и при патологии, и разрабатывает концепцию мозговой пластичности и необходимости поиска эпигенетических факторов, влияющих на развитие мозга и его функций, проявляющихся в поведенческих изменениях. Несомненную научно-практическую ценность представляет предложенная Е.А. Никитиной схема изучения генеза нейропатологии при нейродегенеративных и геномных заболеваниях с учетом генетических и эпигенетических аспектов.

Замечания к работе

Вызывает вопрос формулировка названия диссертации: «Физиологогенетический анализ механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний с привлечением моделей на дрозофиле». Поскольку все представленные в работе результаты получены на *D. melanogaster*, логичнее было бы говорить не о

привлечении моделей, а о выполнении исследований на них: «Физиологогенетический анализ механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний на модели *D. melanogaster*». Так же кажется несколько излишним внимание, уделенное в обзоре литературы классификации и описанию разновидностей нейродегенеративных заболеваний человека.

В качестве еще одного замечания следует отметить чрезмерную насыщенность текста аббревиатурами, что затрудняет чтение диссертации; один только список сокращений занимает в работе 9,5 страниц.

По теме диссертации опубликовано 115 научных работ, из них 16 статей в рецензируемых отечественных и международных журналах. Материалы и основные положения диссертации были представлены на 26 российских и международных конференциях.

Заключение

По совокупности полученных результатов диссертация, представленная Никитиной Е.А., является собой завершенное, систематическое и важное научное исследование, которое содержит комплексный анализ основных признаков нейродегенеративных заболеваний на модели *D. melanogaster*. Полученные автором результаты достоверны, выводы и заключение обоснованы. Замечания по частным вопросам не влияют на общую высокую значимость работы. Автореферат верно отражает основное содержание диссертации.

Диссертация Никитиной Екатерины Александровны «Физиологогенетический анализ механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний с привлечением моделей на дрозофиле» соответствует предъявляемым к докторским диссертациям требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 03.03.01 «Физиология» и 03.02.07 «Генетика».

Отзыв на диссертацию и автореферат составлен заведующим лабораторией генетики стресса, доктором биологических наук Н.Е. Грунтенко.

Отзыв заслушан, обсужден и одобрен на семинаре лаборатории генетики стресса Федерального государственного бюджетного научного учреждения науки Института цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), протокол № 1 от 20 апреля 2015 года.

21 апреля 2015 г.

Заведующий Лабораторией генетики стресса

ИЦиГ СО РАН, д.б.н., с.н.с.

(383)3634953*3103

nataly@bionet.nsc.ru

Н.Е. Грунтенко

Подпись заведующего лабораторией Института цитологии и генетики, доктора биологических наук, старшего научного сотрудника Грунтенко Наталии Евгеньевны удостоверяю

Ученый секретарь ИЦиГ СО РАН

к.б.н.



Г.В. Орлова

СВЕДЕНИЯ О ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Полное название: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук

Сокращенное название: ИЦиГ СО РАН

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр-т акад. Лаврентьева, д. 10.

Телефон: (383) 363-49-80, факс: (383) 333-12-78.

E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru

<http://www.bionet.nsc.ru>