



Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ИБХ РАН)

ул. Миклухо-Маклая, 16/10, ГСП-7, Москва, 117997. Для телеграмм: Москва В-437, Биоорганика
телефон: (495) 335-01-00 (канц.), факс: (495) 335-08-12, E-mail: office@ibch.ru, www.ibch.ru
ОКПО 02699487 ОГРН 1037739009110 ИНН/КПП 7728045419/772801001

04.12.2017 № 401/1-217.1-977

на № _____ от _____



«УТВЕРЖДАЮ»

ВРИО директора ИБХ РАН
академик А.Г. Табибов
4 декабря 2017 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации

на диссертацию **Марии Андреевны Рязанцевой**

«Нарушение активности депо-управляемых кальциевых каналов при наследственной болезни Альцгеймера», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертационная работа М.А. Рязанцевой посвящена исследованию молекулярных механизмов, лежащих в основе развития наследственной формы болезни Альцгеймера. В частности, автор исследует последствия мутации гена пресенилина-1, при которой из аминокислотной последовательности белка исключается сайт эндопротеолиза, что приводит к накоплению полноразмерной формы пресенилина-1, отличающейся существенно большим временем жизни по сравнению с корректно процессированной формой. Актуальность исследования хорошо аргументирована и не вызывает сомнений: болезнь Альцгеймера является наиболее распространенным типом деменции, при этом ее этиология недостаточно изучена, отсутствуют эффективные способы лечения. Так что даже несмотря на то, что наследственная форма является редкой, любой прогресс в области изучения молекулярных механизмов развития заболевания представляется чрезвычайно важным.

Диссертация изложена на 210 страницах, состоит из перечня используемых сокращений, введения, где в том числе сформулированы цель и задачи исследования, а также перечислены опубликованные автором работы по теме диссертации, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 490 ссылок. Работа иллюстрирована 45 рисунками и не содержит таблиц.

Цель своего исследования М.А. Рязанцева видит в разработке клеточных и животных моделей наследственной формы болезни Альцгеймера для выявления нарушений в регуляции внутриклеточной концентрации кальция, поскольку многие работы последних лет указывают на важное место именно нарушения кальциевого гомеостаза в развитии заболевания. Задачи исследования соответствуют цели и раскрывают ее.

Обзор литературы включает несколько сотен ссылок на оригинальные источники. Достаточно подробно описаны разработанные к настоящему времени животные модели болезни Альцгеймера, основанные как на спонтанной, так и на вызванной нейродегенерации. Среди них различные модели, основанные на использовании трансгенных животных. Хорошо обоснованы преимущества и недостатки той или иной модели: доступность и простота в использовании, специфичность, воспроизводимость симптомов болезни Альцгеймера человека, наличие соответствующих гистологических изменений в нервной системе, наличие и сходство ключевых генов и соответствующих молекулярных механизмов с человеком. Достаточно полно представлены имеющиеся в настоящее время сведения, касающиеся этиологии болезни Альцгеймера. Перечислены основные молекулярные участники процесса: белок-предшественник амилоида (APP), его фрагменты, включая β -амилоидные пептиды (A β), ферменты, осуществляющие процессинг APP (секретазы), и их субъединицы (в частности, пресенилины, являющиеся каталитическими субъединицами γ -секретазы), тау-белок – и дано подробное описание их структуры и функций, а также роли в болезни Альцгеймера. Подробно разобраны положения так называемой «амилоидной гипотезы», уделяющей центральную роль в развитии заболевания A β , имеющиеся в литературе доводы как в пользу этой гипотезы, так и против нее; перечислены альтернативные гипотезы. Рассмотрены гены, ассоциированные как с основной спорадической формой заболевания, так и с наследственной. Основное внимание уделено гену пресенилина-1, поскольку в настоящее время наибольшее число описанных мутаций, приводящих к развитию болезни Альцгеймера, характерно именно для этого гена. Перечислены лекарственные препараты, используемые сегодня в клинике для лечения болезни Альцгеймера, а также находящиеся в разработке, и разобран их молекулярный механизм действия. Указаны молекулярные мишени для терапии заболевания, дана характеристика потенциала разработки соответствующих препаратов. Внимание уделено так называемой «кальциевой гипотезе» развития болезни Альцгеймера, ставящей во главу угла нарушение кальциевого гомеостаза в нейронах при патологии. Согласно этой гипотезе, нарушения в регуляции внутриклеточной концентрации Ca^{2+} предшествуют другим стадиям развития заболевания, включая образование повышенного количества A β .

Затем приведены общие сведения, касающиеся депо-управляемых кальциевых каналов: их разнообразия, электрофизиологических характеристик, установленных белков, образующих эти каналы (Orai и TRPC). Кроме того, приводится детальная характеристика белков STIM, являющихся передатчиками сигнала опустошения внутриклеточных кальциевых депо к депо-управляемым кальциевым каналам. Представлены сведения, касающиеся роли депо-управляемого входа Ca^{2+} в физиологических процессах и его нарушений при патологиях. Указана малая изученность механизма нарушения депо-управляемого входа Ca^{2+} при болезни Альцгеймера. Наконец, специальный раздел посвящен фармакологии депо-управляемого входа Ca^{2+} , а именно известным в настоящее время ингибиторам этого процесса, воздействующим на различные молекулярные мишени – как сами депо-управляемые кальциевые каналы, так и сенсоры STIM.

В главе «Материалы и методы» описываются использованные автором методики получения и работы с клеточными культурами, трансфекции, манипуляции с рекомбинантными ДНК и белками, методики электрофизиологии, флуоресцентной микроскопии, иммуноцитохимии и коиммунопреципитации, а также получения и работы с трансгенными линиями дрозофил. В этой главе собрана информация о материалах и реактивах, содержатся необходимые подробности, позволяющие воспроизвести поставленные М.А. Рязанцевой эксперименты.

Глава «Результаты» начинается с краткого обобщения литературных данных, чтобы поместить читателя в контекст проводимых исследований, затем подробно излагаются собственно полученные результаты. Вначале автор использует клетки нейробластомы мыши Neuro2a для демонстрации того, что угнетение активности γ -секретазы ингибитором L-658,458, приводящее к накоплению непротессированной полноразмерной формы пресенилина-1, потенцирует депо-управляемый вход Ca^{2+} и усиливает ток, опосредованный депо-управляемыми кальциевыми каналами (I_{SOC}). Усиление I_{SOC} наблюдается также при экспрессии гена пресенилина-1 человека в клетках Neuro2a и использовании L-658,458 и при экспрессии неактивного мутанта пресенилина-1, неспособного к процессингу. Те же эффекты показаны на линии фибробластов мыши MEF с двойным нокаутом генов пресенилинов при экспрессии мутанта пресенилина-1, неспособного к процессингу. Сходные данные получены диссертантом на выделенных нейронах гиппокампа мыши: экспрессия неактивного мутанта пресенилина-1 человека приводит к повышению амплитуды I_{SOC} .

М.А. Рязанцева представляет эксперименты по определению уровня экспрессии генов белков, принимающих участие в депо-управляемом входе Ca^{2+} , а именно генов депо-управляемых каналов Orai и TRPC и белков-сенсоров STIM. Оказывается, что уровень

экспрессии генов этих белков не различается в клетках Neuro2a или MEF, экспрессирующих ген пресенилина-1 человека дикого типа, его неактивного мутанта, или контрольных клетках.

Автор описывает получение клеток Neuro2a и нейронов гиппокампа мыши, экспрессирующих мутантный ген пресенилина-1 человека, характерный для пациентов с болезнью Альцгеймера (с делецией фрагмента, кодирующего сайт процессинга). Экспрессия мутантного гена приводит к повышению амплитуды I_{SOC} в нейронах гиппокампа. С помощью нокдауна генов *Orai1* и *TRPC1* (использованы малые РНК, образующие шпильки, *shRNA*) М.А. Рязанцева показывает, что депо-управляемые кальциевые каналы в нейронах гиппокампа мыши образованы с участием данных субъединиц, причем эти же каналы ответственны за повышение амплитуды I_{SOC} в условиях экспрессии мутантного гена пресенилина-1 человека.

Клетки Neuro2a, экспрессирующие мутантный ген пресенилина-1 человека, использованы затем для демонстрации усиленного перемещения сенсорных белков STIM1 к плазматической мембране при опустошении кальциевых депо в сравнении с контрольными клетками – с использованием конфокальной микроскопии и экспрессии химерного гена STIM1 и флуоресцентного белка. При помощи коиммунопреципитации М.А. Рязанцева показывает увеличение числа комплексов *Orai1* и STIM1, при этом вестерн-блоттинг не выявляет различий в уровне экспрессии генов этих белков (а также *Orai2*, STIM2 и *TRPC1*). Нокдаун гена STIM1 (но не STIM2) с помощью *shRNA* приводит к падению амплитуды I_{SOC} в нейронах гиппокампа мыши, экспрессирующих мутантный ген пресенилина-1 человека, до контрольных значений. Диссертант делает вывод, что механизм индукции депо-управляемого входа Ca^{2+} в условиях экспрессии мутантного гена пресенилина-1 состоит в повышенной активации STIM1.

Важная часть «Результатов» посвящена экспериментам с трансгенными дрозофилами, геном которых содержит мутантный ген пресенилина-1 человека под контролем промотора, специфичного для холинергических нейронов. М.А. Рязанцева показывает, что экспрессия этого гена приводит к нарушению кратковременной памяти у «умеренно состарившихся» животных. Для этого используется достаточно распространенный тест на обучение самцов не воспринимать нерецептивную самку. Далее автор использует известный блокатор депо-управляемого входа Ca^{2+} 2-аминоэтоксидифенилборат (2-APB), который добавляет в пищу дрозофилам, в результате наблюдает возвращение способности к обучению.

В главе «Обсуждение» М.А. Рязанцева суммирует полученные ею данные, приводит их сопоставление с известными фактами из литературы и предлагает логичное объяснение наблюдаемым явлениям. Наиболее важные положения автор выносит в «Заключение».

Диссертант считает, что в случае наследственной болезни Альцгеймера, связанной с инактивирующей мутацией в гене пресенилина-1, происходит индукция депо-управляемого входа Ca^{2+} , а главным посредником в этом процессе выступает сигнальный белок STIM1.

Полученные в работе результаты отличаются высокой степенью новизны и значимости для дальнейших исследований молекулярных механизмов развития болезни Альцгеймера. Наиболее важными нам представляются два результата: (1) охарактеризованы удобные модели (клетки Neuro2a и нейроны гиппокампа мыши, экспрессирующие мутантный ген пресенилина-1 человека; трансгенные дрозофилы), которые можно использовать для поиска лекарств; (2) депо-управляемые кальциевые каналы и белок STIM1 представлены как возможные фармакологические мишени для терапии болезни Альцгеймера.

Работа выполнена на высоком методическом уровне. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. Сделанные автором выводы хорошо продуманы и аргументированы. К недостаткам следует отнести следующее.

1. Присутствует некоторая неточность в терминологии и формулировках. Например, фосфолипаза C гидролизует фосфатидилинозитолдифосфат, а не сам инозитол (как указано на странице 8). «Холинергический» принято писать с -е-, а не -э-, и этот термин следует использовать для характеристики отдельных синапсов или нейронов, но не нервной системы в целом. На страницах 26-27 речь идет о «патогенной конформации» пресенилина-1, однако что это такое не объясняется. Описание β -структуры, представленное на странице 40, неточно, рекомендуется использовать определение, распространенное в специальной литературе. Вместо «N-, C-терминальный» лучше говорить просто «N-, C-концевой». При описании строения мембранных белков для обозначения участков белковой цепи, пронизывающих мембрану, лучше использовать термин «трансмембранные сегменты», а не домены. На странице 66 указано неверное английское название 2-APB (2-аминоэтоксидифенилбората). В описании раствора, использовавшегося для лизиса клеток линии Neuro2a, читаем (страница 85): «...0,5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride и ингибиторами протеаз». Сокращенное название PMSF уже было использовано (без расшифровки) раньше, кроме того, PMSF сам является ингибитором протеаз, поэтому непонятно, использовался ли на самом деле он здесь в таком качестве, какие другие ингибиторы были использованы. На странице 86 время элонгации при ПЦР составляет 2 с, что представляется слишком малой величиной, по-видимому, имелось в виду 20 с. На странице 87 используется выражение «реакция инактивирована», лучше говорить «реакция остановлена» или «прекращена». «Лентивирусы» рекомендуется писать слитно, без дефиса. Использование англоязычных терминов, например, Student's *t* test, one-way ANOVA, для которых существуют общепринятые русскоязычные термины, нам кажется

неоправданным. Мемантин (автор использует английский термин) не агонист, а антагонист глутаматных рецепторов NMDA-типа, именно вследствие его антагонистической активности снижается приводящий к «эксайтотоксичности» вход Ca^{2+} в нейроны.

2. С одной стороны, болезнь Альцгеймера связывают с избыточным накоплением определенных Аβ, которые образуются вследствие активности γ-секретазы. С другой стороны, наследственная форма заболевания ассоциирована с мутациями в гене пресенилина-1, приводящими к потере функции. Данное противоречие не раскрыто. Есть ли предположения, как его можно объяснить?

3. Не приводятся данные, противоречащие кальциевой гипотезе, или ее критика. Связано ли это с отсутствием таких данных или дискуссии в литературе? Не уделено внимания получившей распространение в последнее время гипотезе о ведущей роли митохондрий в патогенезе болезни Альцгеймера, в том числе в рамках кальциевой гипотезы. В разделе о фармакологии депо-управляемого входа Ca^{2+} не хватает заключения, в котором следовало бы указать на те соединения, которые обладают, по мнению автора, наибольшим потенциалом для фундаментальных исследований и практического использования.

4. На рисунке 20Б очевидна разница вольтамперных характеристик I_{SOC} в контрольных и обработанных ДМСО клетках в области потенциалов больше потенциала реверсии. Данное обстоятельство не обсуждается. То же касается различий вольтамперных характеристик I_{SOC} в клетках Neuro2a или MEF в сравнении с нейронами гиппокампа мыши при экспрессии неактивного мутанта пресенилина-1 (рисунки 24А, 25А и 28А). При этом эффект в случае вольтамперных характеристик I_{SOC} в нейронах гиппокампа мыши с экспрессией нормального или мутантного гена пресенилина-1 человека и shRNA против STIM1 или STIM2 (рисунки 38А, 39А и 40А) автор объясняет специфическими свойствами STIM2.

5. Отсутствие влияния подавления экспрессии гена STIM1 на I_{SOC} в нейронах гиппокампа мыши диссертант объясняет преимущественным значением STIM2 в этих клетках. Однако при этом не объясняется такое же отсутствие влияния подавления экспрессии гена STIM2 на амплитуду I_{SOC} (рисунок 40А), при том что компенсаторной гиперэкспрессии STIM1 не наблюдается (рисунок 41).

6. Автор не обсуждает возможность использования результатов своей работы в случае спорадической формы болезни Альцгеймера. В обзоре литературы указывается, что наследственная форма сильно отличается от спорадической, затрагивают ли эти отличия и депо-управляемый вход Ca^{2+} ?

7. Выводы 2 и 4 практически совпадают, их следовало бы объединить.

Указанные недостатки не снижают общего удовлетворения от ознакомления с текстом диссертации. Результаты работы и представленные выводы соответствуют

поставленным цели и задачам исследования. Диссертационная работа М.А. Рязанцевой соответствует заявленной специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Автореферат достаточно хорошо отражает содержание, основные результаты и выводы диссертации, хотя для понимания некоторых моментов сложно обойтись без полного текста диссертации. Например, большая часть работы уделена экспериментам с трансгенными дрозофилами как моделью наследственной болезни Альцгеймера, однако обоснование применимости такой модели (у дрозофилы обнаружены гомологи генов человека, ассоциированных с заболеванием) представлено только в полном тексте диссертации.

По материалам работы опубликовано три статьи в ведущих научных журналах в области клеточной биологии и молекулярной нейробиологии. Результаты докладывались диссертантом на многих российских и международных конференциях, в том числе на 38-м и 39-м конгрессах ФЕБО, 9-м форуме Федерации европейских обществ по нейронаукам.

Результаты, полученные М.А. Рязанцевой, могут быть использованы для научных исследований в различных институтах РАН (например, в Институте цитологии, Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии, Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова, Институте биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии»), в Институте физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, а также в других профильных научных учреждениях. Работе свойственна высокая практическая значимость: охарактеризованные модели могут использоваться как в фундаментальных исследованиях, так и при разработке лекарств, кроме того, полученные результаты указывают на новый возможный способ терапии болезни Альцгеймера, а именно использование ингибиторов депо-управляемых кальциевых каналов.

Отметим, что в базе данных PubMed зарегистрированы 11 статей с соавторством М.А. Рязанцевой, в том числе в ведущих биохимических журналах. Знакомство с этими статьями показывает, что широта научных интересов диссертанта не ограничивается ролью депо-управляемых кальциевых каналов при болезни Альцгеймера, а включает также другие функциональные аспекты депо-управляемых кальциевых каналов и молекулярные механизмы развития хореи Гентингтона. Высокий уровень подготовки диссертанта в области клеточной и молекулярной нейробиологии не вызывает сомнений.

Диссертация соответствует требованиям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства РФ от 24

сентября 2013 г. № 842, в действующей редакции от 28 августа 2017 г., в том числе пп. 9-14 данного Положения, а ее автор, Мария Андреевна Рязанцева, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

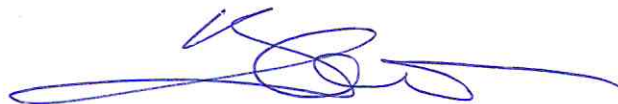
Отзыв обсужден и утвержден на семинаре лаборатории молекулярных инструментов для нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, протокол № 5 от 30 ноября 2017 г. (журнал научных коллоквиумов лаборатории молекулярных инструментов для нейробиологии).

Заведующий лабораторией
молекулярных инструментов для нейробиологии ИБХ РАН,
к.х.н. А.А. Василевский
специальность 02.00.10 – биоорганическая химия



«Подпись А.А. Василевского заверяю»

Ученый секретарь ИБХ РАН,
д.ф.-м.н. В.А. Олейников



Контактная информация:

117997, г. Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, ИБХ РАН

Телефон канцелярии: +7 (495) 335-01-00

Эл. почта: office@ibch.ru

Официальный сайт: www.ibch.ru