

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Авериной Ольги Александровны на соискание ученой степени кандидата химических наук на тему: «Изучение физиологической роли нового митохондриального белка Миторегулина на модели мышей с отредактированным геномом» по специальности 1.5.3. - Молекулярная биология

Диссертация посвящена интересной, важной и актуальной задаче – исследованию физиологической роли митохондриального пептида миторегулина с использованием в качестве модели мышей с отредактированным геномом. В последние годы все больше привлекает внимание исследователей поиск мутаций в генах кодирующих малоизвестные белки митохондрий, возможно влияющих на физиологические изменения в организме и сцепленных со сложными заболеваниями. В качестве модели для изучения генетических митопатологий часто используются нокаутные по таким генам мыши. Миторегулин, находящийся в центре данного проекта кодируется геном *1500011k16Rik*, состоит из 56 аминокислот и высококонсервативен у позвоночных. Он локализуется в межмембранном пространстве митохондрий и благодаря наличию трансмембранного сегмента связан с мембраной. Согласно литературным данным миторегулин участвует в ряде биологических процессов, таких как контроль дыхания митохондрий, взаимодействуя с комплексом I респираторной цепи, влияние на состав липидов, окисление жирных кислот, взаимодействие с АТФ-синтазой и т.д. Однако, данные о функциях этого белка в литературе достаточно противоречивы. Именно поэтому диссертантка предприняла попытку создать мышинную модель и более детально исследовать фенотипические, физиологические и биохимические последствия нокаута гена, кодирующего миторегулин. Совершенно очевидно, что анализ и понимание как можно больших функций митопептида принципиально важно для фундаментальной науки и может иметь далеко идущие последствия для медицины. Данная диссертация представляет собой фундаментальное исследование, раздвигающее пределы наших знаний об одном из митопептидов.

Цель исследования - изучение физиологической роли митохондриального белка миторегулина на модели мышей с отредактированным геномом.

Для достижения цели автор поставила перед собой **две тесно связанные задачи**, включающие сравнительный анализ и подбор оптимальных технологий и условий для создания мутантных мышей; подробное фенотипирование мышей, нокаутных по гену *1500011k16Rik*, кодирующему миторегулин.

Объём и структура диссертации. Диссертация построена по классической схеме, изложена на 236 страницах машинописного текста и состоит из оглавления, введения, обзора литературы, материалов и методов, описания результатов и их обсуждения, заключения и выводов, списка сокращений и достаточно длинного списка литературы, который включает 646 источников. Она иллюстрирована 43 рисунками и 9 таблицами.

Во **введении** определены актуальность проблемы, степень ее разработанности, цели, задачи, объект и предмет исследования, его научная новизна, теоретическая и практическая значимости, методология диссертационного исследования, основные положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов, информация об апробации работы, публикациях и личном вкладе диссертанта. Данный раздел написан весьма четко и подробно.

Обзор литературы состоит из 3х частей. Он отлично структурирован, содержит огромный объем современной информации. Автор показала способность критически оценивать состояние вопроса, уверенно владеет терминологией и четко выделяет наиболее важные и спорные проблемы. Анализ литературы весьма детальный и глубокий. Особенно хотелось бы выделить рисунки и схемы. Они настолько детальные, что позволяют легко понять все сложности проблемы. Логичность изложения и тонкое ведение читателя от общих вопросов к собственному исследованию вызывают чувство уважения к автору. Обоснованность важности изучения митохондриального пептида миторегулина не вызывает сомнений у читателя.

В первой части обзора обсуждаются современные данные о специфике CRISPR/Cas опосредованного редактирования генома. Автор детально описывает эндонуклеазную систему редактирования генома CRISPR/Cas, системы репарации двухнитевых разрывов ДНК и их ингибиторов, которые очень критично разобраны. Диссертантка показывает насколько важны знания контроля клеточного цикла и статус хроматина для редактирования генома, как необходимо проводить редактирование оснований и праймированное редактирование. Особенно интересна часть, касающаяся

путей эффективной доставки конструкций для редактирования генома. В этом разделе приводятся данные об ограничениях и сложностях применения систем редактирования, о сложностях обнаружения с помощью классического скрининга непредвиденных делеций. Еще раз хочу подчеркнуть качество иллюстраций, очень помогающее понять излагаемое.

Во второй части литературного обзора приводится описание митохондриальных пептидов. Детальная информация касается длинных некодирующих РНК, коротких открытых рамок считывания, микропептидов и их роли в различных биологических процессах, особенно микропептидов, имеющих митохондриальное происхождение. Интересным является раздел, касающийся митохондриальных пептидов, кодируемых ядерным геномом. Ну и наконец, подробная информация о миторегулине, истории его открытия, обнаруженных проблемах с кодирующей его мРНК, локализации в клетках и известных на сегодняшний день функциях, а также данных по его инактивации. При чтении этого раздела вызвало улыбку «разъяснение», что арабидопсис является лабораторным растением...

Третий раздел обзора включает описание митохондриальных заболеваний, вызванных мутациями в ядерных генах, для изучения которых в настоящее время имеются модели животных. Он включает большую часть митохондриальных расстройств и частоты их появлений. Особое внимание уделено проблемам, связанных с дефицитом митохондриального комплекса I, вызванного мутациями ядерной ДНК. Приводятся данные о современной дискуссии, касающейся выбора модели исследования митохондриальных расстройств. Раздел завершает сводная таблица модели митохондриальных заболеваний, вызванных мутациями в ядерных генах. Она не просто хороша, она очень полезна и может быть опубликована в виде отдельной статьи.

Считаю необходимым подчеркнуть наличие кратких, но вполне логичных заключений в конце каждого раздела литературного обзора. Они интересны и важны для понимания всего изложенного материала. Это, к сожалению, достаточно редко наблюдается в диссертационных работах. Еще раз следует подчеркнуть высокое качество данного раздела диссертации. О. А. Аверина выступает как сложившийся исследователь.

Затем следует раздел «**Материалы и методы**». Высокий методический уровень – важное достоинство диссертации. Технологически работа выполнена безукоризненно. Масса современных генетических, молекулярно-биологических, биохимических, гистологических и физиологических методов исследования, а также большое количество

контролей позволяют не сомневаться в достоверности полученных результатов. Этот раздел изложен подробно и убедительно. Методические процедуры, при наличии специальных знаний (особенно по работе с животными), можно воспроизвести по описанным методикам. В этом разделе диссертации автор также показывает высокий профессионализм и хорошую научную школу.

Далее представлены **результаты собственных исследований и их обсуждение**. Основной результат диссертации – новые данные о физиологической роли митопептида миторегулина, полученные с помощью анализа мышей с отредактированным геномом. Для того, чтобы получить таких мышей, автор прежде всего попыталась решить задачи, направленные на оптимизацию как процесса создания генетической конструкции, так и технологии манипуляции с мышами, подвергающимися генетическим изменениям. Ею проведен сравнительный анализ эффективности гомологичной рекомбинации, направляемой различными ДНК матрицами с технологией праймированного редактирования второго поколения на модели микроинъекции зигот мышей, а затем подобраны оптимальные условия для получения максимально возможного количества зигот мышей для микроинъекций и эффективной подсадки эмбрионов для рождения максимально возможного числа жизнеспособных особей.

Для каждой зоны редактирования был создан набор матриц eгРНК и оцОНК длиной 200 нуклеотидов для гомологичной рекомбинации, нацеленного на запланированную зону мутации и regRNA для варианта редактора второго поколения (PE2), для введения целевой мутации. Важно было сконструировать последовательности eгРНК и regРНК таким образом, чтобы минимизировать расстояние между местами разрывов и предполагаемыми участками мутации при этом избежать повторного расщепления ДНК после успешного мутагенеза. В общей сложности более 2000 зигот было микроинъектировано. В среднем, показатели выживаемости зигот и успешного развития до стадий морул и бластоцист после микроинъекций были сопоставимы для редактирования генома гомологичной рекомбинацией и посредством варианта редактора второго поколения. Дальнейший анализ показал, что точность редактирования генома, представленная как соотношение между частотой генерации целевых мутаций и побочных продуктов, сопоставима для всех типов матриц, используемых в пути репарации по гомологичной рекомбинации. На основании полученных результатов автор заключила, что технология

егРНК-направленного расщепления ДНК-мишени Cas9, при последующей гомологичной рекомбинации с использованием матрицы оцДНК, остается оптимальным выбором для создания мышей с целевым изменением генома.

Так как критической точкой в схеме создания мутантных мышей является выживаемость эмбрионов после введения генетической конструкции, диссертанткой были подобраны линии мышей, самки которых производят зиготы, более устойчивые к проникновению микроинъекционной иглы и подходящие по структуре для пронуклеарных введений. Хочется еще раз подчеркнуть, что количество приведенных контролей вызывает большое уважение. На основании проведенных экспериментов было сделано заключение, что при разработке протокола создания мутантных мышей необходимо учитывать оптимизацию абсолютно каждого этапа для получения крупных жизнеспособных пометов мышей с измененным геномом.

Во второй части экспериментальных исследований на полученной модели мышей был проведен анализ фенотипических, физиологических и биохимических последствий нокаута гена *1500011k16Rik*, кодирующего миторегулин. Анализ тканей, выделенных из ряда органов полученных нокаутных мышей, подтвердил репрезентативность мутантной модели. В связи с тем, что из литературы известно участие миторегулина в различных процессах, автор сосредоточилась на исследовании влияния миторегулина на окислительный метаболизм мышей, на его функциональную роль в скелетных мышцах мышей и, наконец, на функцию почек мышей.

Диссертанткой обнаружены признаки ожирения даже у тех нокаутных мышей, которые питались обычным кормом. Анализ уровня свободных жирных кислот в сыворотке крови нокаутных мышей, получавших обычный корм, выявил у них заметное снижение количества насыщенных жирных кислот, сопровождающееся увеличением уровня полиненасыщенной докозагексаеновой кислоты. Более того, у нокаутных мышей был существенно повышен уровень лактата и триглицеридов, но не глюкозы и холестерина. Таким образом сделано заключение о влиянии миторегулина на бета-окисление жирных кислот мышей. Исследование функциональной роли миторегулина в скелетных мышцах выявило зависимость нормального функционирования мышечной ткани у мышей от активности этого белка.

С помощью гистопатологического анализа у нокаутных мышей не было обнаружено значительного повреждения митохондрий мышц. Однако,

автор не исключает того, что более тонкие различия могут быть обнаружены с помощью электронной микроскопии.

В связи с тем, что имеющаяся в литературе информация о роли миторегулина в митохондриальном дыхании не однозначна, автор решила уделить внимание данному вопросу. Для этого митохондрии выделялись из оксидативных (камбаловидная) и гликолитических (передняя большеберцовая) мышц и использовался большой арсенал субстратов. Результаты анализа скорости дыхания выделенных митохондрий показали, что не стимулированное дыхание характеризуется незначительными различиями только на субстрате пальмитоил-карнитин. Более того, показано, что миторегулин обеспечивает сохранность пула кардиолипина, необходимого для функционирования комплекса I дыхательной цепи и митохондриальной креатинкиназы. Ранее нами и профессором Валерианом Коганом была показана роль окисления кардиолипина в освобождении цитохрома *c* и его выходе из межмембранного пространства в цитозоль, необходимых стадий запуска митохондриального пути апоптоза. Было бы интересно выяснить роль миторегулина в этом механизме.

Важным достижением исследования было выяснение того, что опосредованные дисфункцией миторегулина патологические состояния мышцей связаны со снижением эффективности митохондриального комплекса I дыхательной цепи.

Наконец, проведен анализ влияния миторегулина на функцию почек мышцей. Прежде всего автором были обнаружены изменения морфологии почек при инактивации миторегулина. Интересно, что в большинстве органов, не считая скелетных мышц, отсутствие миторегулина не вызывало значительных патологических различий по сравнению с таковыми у мышцей дикого типа. При инактивации миторегулина обнаружено нарушение дыхания митохондрий почек, показано, что олигомеризация и активность митохондриальной креатинкиназы почек зависят от функциональности исследуемого белка. Нокаут миторегулина вызывал снижение скорости клубочковой фильтрации в почках. Важно также отметить, что инактивация миторегулина нарушало экспрессию почечных генов. На основании полученных данных сделан вывод о том, что инактивация миторегулина у мышцей приводит к зависящим от возраста и пола патологиям почек, представляющим угрозу жизни.

Экспериментальный раздел хорошо продуман и очень детален. Как отмечалось выше, количество приведенных контролей впечатляет, что

говорит о тщательности проведенного исследования, конечно же, отражающей подходы научной школы.

Раздел “Обсуждение результатов” раскрывает умение диссертантки критически анализировать собственные данные. Как и предыдущие разделы, эта часть написана ясным языком. Автор представила интересное толкование собственных научных результатов с привлечением данных мировой литературы. Представленная на рисунке 43 модель функционирования миторегулина элегантно суммирует имеющиеся в настоящее время знания об этом митопептиде.

По моему мнению, если диссертационная работа после внимательного прочтения не вызывает вопросов, то, скорее всего ее и не стоит серьезно обсуждать. При прочтении данной работы возникло несколько прежде всего дискуссионных вопросов.

1. Диссертантка логично описывает участие микропептидов в различных биологических процессах. Пригласив меня в качестве оппонента, она почему-то игнорировала участие этих соединений, в том числе и митохондриальных, в регуляции гибели клеток. Термин апоптоз использовался один раз в описании микропептидов. Хотелось бы услышать более подробно об этом.
2. Диссертантка пишет, что внутренняя мембрана митохондрий обладает самой высокой долей микропептидов, но не раскрывает причины такой селективности. Так почему же?
3. Из литературного обзора ясно, что имеются другие примеры мышей с нокаутом миторегулина. Чем отличаются эти мыши от полученных диссертанткой?
4. Ранее в лаборатории, в которой выполнялась данная работа, детально исследовался митохондриальный пептид L116, который также опосредованно взаимодействует с комплексом I. Имеется ли связь между этим пептидом и миторегулином? Если да, то какова она?
5. Автор сообщает, что транскрибируемые lncРНК локализуются в цитоплазме, а нетранскрибируемые – преимущественно в ядре. Однако, известно, что более 20 lncРНК так или иначе связанных с митохондриями. Это ведь никак не исключение?
6. В одном из разделов обзора литературы при описании митохондриального микропептида, гуманина, автор обозначила белок IGFBP3 как проапоптотический, наравне с белком Вах. Насколько мне известно, Вах действительно является одним из наиболее известных

проапоптотических белков, относящихся к семейству Bcl-2. Однако, IGFBP3 таковым не является. Или я не прав?

Совершенно очевидно, что мои вопросы ни в коей мере не умаляют значимости диссертации как современного высококвалифицированного инновационного исследования актуальной научной проблемы.

Выводы сформулированы четко, они достоверны, логично и обоснованно вытекают из результатов исследования и соответствуют поставленным задачам.

Список литературы отражает разносторонность подхода автора, он огромен и содержит источники последних лет.

По материалам диссертации **опубликовано 5** отличных статей в известных международных журналах. Необходимо подчеркнуть, что во всех публикациях О.А. Аверина является первым автором, что говорит об ее принципиально важной роли в выполненном исследовании. Публикации несомненно отражают основные положения диссертационной работы.

Таким образом, О.А. Аверина выполнила современное фундаментальное исследование. Ценность и новизна полученных диссертанткой результатов состоит в установлении физиологической роли митохондриального белка миторегулина на полученной ею модели мышей с отредактированным геномом. Следует подчеркнуть, что диссертация выполнена в Институте функциональной геномики, НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ - в научном коллективе, заслужившем авторитет как в России, так и в мире. У оппонента нет никаких сомнений в том, что О.А. Аверина сформировалась как самостоятельный научный сотрудник, получивший отличную профессиональную подготовку и способный самостоятельно решать новые задачи.

Заключение

Диссертация **Авериной Ольги Александровны «Изучение физиологической роли нового митохондриального белка Миторегулина на модели мышей с отредактированным геномом»** отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.3. Молекулярная биология (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно требованиям Положения о совете по

защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Аверина Ольга Александровна заслуживает
присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности
1.5.3. - Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор,
руководитель Лабораторией исследования механизмов апоптоза,
Факультета фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова
Животовский Борис Давидович

14 ноября 2023 г.

Специальности, по которой защищена последняя диссертация:

1.5.1 - Радиобиология; 1.5.4 – Биохимия.

Адрес места работы:

Ломоносовский пр-т., дом 27, корп. 1, Москва, 119991, Россия
ФГБОУ высшего образования «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова», Факультет фундаментальной медицины.

Подпись Б.Д. Животовского заверяю: