

## ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертационную работу Кузиной Екатерины Сергеевны  
«Убиквитин-независимый протеолиз основного белка миелина и его роль в развитии  
экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита»,  
представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук  
по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия**

Работа Кузиной Екатерины Сергеевны посвящена изучению роли протеасомного гидролиза основного белка миелина (МВР) в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита (ЕАЕ), который рассматривается в качестве животной модели рассеянного склероза (РС). Актуальность изучения фундаментальных основ развития этого аутоиммунного нейродегенеративного заболевания не вызывает сомнений, особенно учитывая, что этиология РС до сих пор не известна.

Патогенез данного заболевания включает в себя повреждение миелиновой оболочки нервных волокон. В разрушении миелиновых волокон и координации аутоиммунной атаки на ЦНС принимают участие в основном CD4+Т-лимфоциты (Т-хелперы), а также цитотоксические CD8+ Т-лимфоциты (CTL). Одним из основных аутоантигенов, на который направлен иммунный ответ, является основной белок миелина МВР. Формирование антигенных пептидов, презентруемых на молекулах главного комплекса гистосовместимости первого класса (МНС I), которые и узнаются клетками CTL, происходит в результате их гидролиза 26S протеасомой. Таким образом, деградация основного белка миелина протеасомой и презентация образующихся пептидов на молекулах МНС I несомненно являются фундаментальными вопросами при изучении патогенеза РС.

В обзоре литературы представлено современное представление о протеасоме, её структуре и каталитических свойствах. Описано отличие строения и свойств конститутивной протеасомы от иммунопротеасомы. Предполагается, что именно иммунопротеасома в основном ответственна за генерацию антигенных пептидов. Также представлено описание системы убиквитинилирования, необходимой для деградации белков протеасомой по убиквитин-зависимому пути. Отмечено существование альтернативного механизма, при котором гидролиз белков протеасомой осуществляется без моно- или полиубиквитинилирования. Имеются разделы, описывающие известные на сегодняшний день ингибиторы конститутивной и иммунопротеасомы, а также современное представление о механизме презентации антигенов на молекулах главного комплекса гистосовместимости. Второй раздел обзора литературы посвящен рассеянному склерозу и описанию его общепринятой животной модели - экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита. Представлена подробная информация об основном белке миелина, особенностях его структуры, биохимических свойствах. Приведены обоснования возможного участия иммунопротеасомы в процессе развития РС.

В разделе результаты и обсуждения описаны результаты, проведенных автором исследований, и их значение. Большая часть работы посвящена изучению внутриклеточной деградации МВР протеасомой в клетках млекопитающих. В ходе исследования использовались современные методы молекулярной и клеточной

биологии. На основании экспериментов с использованием клеточных культур и бесклеточных систем с многочисленными контролями автором представлены убедительные доказательства того, что МВР может быть гидролизован протеасомой в отсутствие полиубиквитинилирования. Дальнейшие исследования показали, что взаимодействие МВР с протеасомой во многом обусловлено его высоким положительным зарядом. Так скорость гидролиза 26S протеасомой ацетилированной и деиминированной форм МВР, обладающих меньшим положительным зарядом, существенно замедлялась по сравнению с немодифицированным природным МВР. Автором получены данные, свидетельствующие о том, что в живой клетке один из механизмов, защищающих МВР от гидролиза протеасомой, может быть его взаимодействие с такими белками, как кальмодулин и актин.

Вторая часть работы посвящена изучению физиологической значимости деградации МВР иммунопротеасомой. На животной модели было показано, что при развитии аутоиммунной патологии, исследуемой в настоящей работе, в ЦНС происходит смещение баланса между конститутивной и иммунопротеасомой в сторону увеличения последней, в том числе в отделах головного мозга, в норме защищенных ГЭБ. Иммуногистохимическое исследование срезов головного мозга экспериментальных мышей позволило продемонстрировать, что иммунопротеасомы, содержащие субъединицу  $\beta 1i$ , накапливаются в резидентных клетках ЦНС, а содержащие субъединицу  $\beta 5i$ , скорее всего, привносятся в ЦНС извне через поврежденный ГЭБ.

Для проверки гипотезы, что убиквитин-независимый протеолиз МВР протеасомами из ЦНС здоровых мышей и мышей с ЕАЕ может приводить к различным спектрам пептидных фрагментов, был проведен масс-спектрометрический анализ продуктов гидролиза МВР протеасомой. В процессе исследования была получена детализированная картина посттрансляционных модификаций МВР. Установлено, что основными посттрансляционными модификациями МВР являются ацетилирование N-конца, моно- и диметилирование остатков аргинина-106, фосфорилирование треонина-97, окисление метионина-19 и метионина-166. Поскольку процесс ферментативной деградации основного белка миелина может протекать по двум основным путям – с помощью протеасомы и протеаз, автором отдельное внимание было уделено доказательству того, что паттерны гидролиза протеасомой из головного мозга мышей значительно отличались от паттернов гидролиза протеолитическими ферментами, предположительно ассоциированными с развитием рассеянного склероза. Показано, что спектры пептидов, образуемых под действием протеасомы из головного мозга здоровых и развивающих ЕАЕ мышей, заметно отличаются друг от друга. Пептиды, полученные под действием протеасомы из головного мозга развивающих ЕАЕ мышей, существенно перекрывались с основными Т-клеточными эпитопами МВР. Максимальное количество пептидов длиной 8 аминокислотных остатков, оптимальной для презентации на МНС I, было получено под действием протеасом из головного мозга мышей, развивающих ЕАЕ.

Для количественного сравнения относительного содержания пептидов МВР в протеасомных гидролизатах был разработан метод, основанный на применении воды, содержащей нуклид кислорода  $18O$ . Была проведена количественная оценка образования более 250 фрагментов МВР под действием протеасом из мышей линий BALB/c и SJL с и без ЕАЕ. Из этого количества 5 пептидов по структуре подходили для загрузки на МНС I. Важно, что количество двух из этих пептидов, DTGILDSL

(MBP33-40) и ENPVVHFF (MBP83-90) увеличивалось в 10 раз при гидролизе MBP протеасомой из мозга SJL с EAE в сравнении с мышами линии BALB/c.

Далее автором было продемонстрировано, что обнаруженный фрагмент ENPVVHFF действительно может являться антигенным пептидом. Мононуклеарные клетки из периферической крови мышей линии SJL с целевым гаплотипом H-2s, а также с гаплотипами H-2k и H-2d в качестве положительного и отрицательного контролей, инкубировали с синтетическим пептидом ENPVVHFF. Методом количественной масс-спектрометрии с мониторингом множественных реакций исследуемый пептид был обнаружен в образцах лизатов клеток с гаплотипами H-2k и H-2s, но не обнаружен в клетках с гаплотипом H-2d. Это позволяет сделать вывод, что фрагмент MBP83-90 действительно может презентироваться на MHC I у мышей SJL с гаплотипом H-2Ks. Методом активации *ex vivo* были получены цитотоксические Т-лимфоциты из мышей линии SJL, специфичные к ENPVVHFF. Цитотоксические ENPVVHFF-реактивные Т-лимфоциты специфически лизировали олигодендроциты, полученные из мышей линии SJL, при этом этот процесс ингибировался анти-MHC I антителами и его эффективность значительно увеличивалась в случае олигодендроцитов, обработанных интерфероном-гамма. На основании полученных данных был сделан вывод, что при развитии EAE меняется состав каталитических субъединиц протеасомы (увеличивается содержание иммуносубъединицы  $\beta 1i$ ), что создает условия для процессинга и презентации аутоантигенов, приводящей к активации специфичных к нейроантигенам Т-клеток и дальнейшему прогрессу аутоиммунной патологии.

Автором также были исследованы некоторые подходы к направленному подавлению гидролиза MBP протеасомой для терапии EAE. Применение подхода с использованием малых интерферирующих РНК (siRNA) к иммуносубъединицам протеасомы  $\beta 1i$  и  $\beta 5i$ , показало, что снижение уровня экспрессии данных иммуносубъединиц может также приводить и к ингибированию внутриклеточного протеолиза MBP, однако недостаточного для эффективного применения в качестве метода терапии EAE *in vivo*. Следует отметить, что в данных экспериментах исследователь не обратил внимание на проблему возможных «оф-тагетов» при обработке клеток siRNA. Возможно именно неспецифическое действие использованных siRNA не позволило достичь желаемого результата.

В качестве еще одного подхода к блокированию протеолитической активности иммунопротеасомы были использованы низкомолекулярные ингибиторы PS-341, MG-132 и  $\beta 1i$ -специфический пептидилэпоксикетон. Все три протестированных ингибитора существенно замедляли гидролиз MBP 26S протеасомой *in vitro*. В случае  $\beta 1i$ -специфического пептидилэпоксикетона, эффективность ингибирования напрямую зависела от содержания иммуносубъединиц протеасомы. Наиболее эффективно данный ингибитор подавлял активность протеасомы из головного мозга EAE-SJL мышей, при этом он практически не воздействовал на протеасому из головного мозга мышей линии BALB/c. Тестирование ингибиторов PS-341 и  $\beta 1i$ -специфического пептидилэпоксикетона на SJL мышах показало, что  $\beta 1i$ -специфический пептидилэпоксикетон снижает тяжесть протекания заболевания эффективнее, чем PS-341 в той же дозировке (0,5 мг/кг). На основании полученных данных сделано предположение о перспективности применения ингибиторов иммунопротеасомы, в том числе  $\beta 1i$ -специфических пептидилэпоксикетонов, в качестве терапевтических средств против аутоиммунных заболеваний ЦНС.

В работе Кузиной Екатерины Сергеевны получены новые данные, позволяющие сделать предположение о вовлеченности убиквитин-независимого гидролиза МВР иммунопротеасомой в развитие аутоиммунных патологий ЦНС. Продемонстрирована потенциальная перспективность применения ингибиторов иммунопротеасомы для терапии аутоиммунных заболеваний ЦНС. Работа выполнена на высоком современном уровне. Написана грамотным языком, аккуратно оформлена, понятно и логично изложена, хотя встречаются опечатки и не до конца переведенные с английского языка фрагменты текста из опубликованных автором статей. Однако указанные замечания не умоляют достоинства работы, достоверности и ценности полученных результатов. Автореферат и публикации полностью отражают содержание диссертации.

Диссертационная работа Кузиной Е. С. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям, изложенным в пунктах 9-14 Постановления Правительства Российской Федерации «О порядке присуждения учёных степеней» (№842 от 24 сентября 2013 г.). Автор работы Кузина Екатерина Сергеевна, несомненно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Начальник отдела трансляционной онкологии  
Московского научно-исследовательского  
онкологического института им. П.А. Герцена  
– филиал федерального государственного  
бюджетного учреждения «Национальный  
медицинский исследовательский радиологический  
центр» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации,  
доктор биологических наук,  
профессор, член-корреспондент РАН

А.Г. Тоневицкий

Подпись Тоневицкого Александра Григорьевича заверяю:

Учёный секретарь  
Московского научно-исследовательского  
онкологического института им. П.А. Герцена  
– филиал федерального государственного  
бюджетного учреждения «Национальный  
медицинский исследовательский радиологический  
центр» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации,  
кандидат биологических наук

Т.В. Данилова



21 мая 2015 г.

125284, Москва  
2-й Боткинский пр., д.3  
Тел.: +7 (495) 150-11-22  
E-mail: tonevitsky@mail.ru