

ОТЗЫВ

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

На протяжении последних десятилетий непрерывно развиваются и расширяются научные представления о механизмах иммунных реакций. Благодаря этому корректное описание процессов индукции и регуляции иммунного ответа требует учета уже десятков взаимодействующих друг с другом молекулярных и клеточных систем. Однако увеличение массива имеющихся сведений не всегда сопровождается систематизацией представлений о природе различных дисфункций иммунной системы. Как правило, предлагаемые объяснения патологий сводятся к рассмотрению одного из участников иммунохимических или регуляторных взаимодействий. В результате рекомендации о терапевтических воздействиях для предотвращения иммунологических расстройств эволюционируют медленно и не всегда оказываются эффективными в *in vivo* системах.

Сложность регуляции иммунных процессов особенно ярко проявляется при рассмотрении аутоиммунных заболеваний, для которых по-прежнему отсутствуют универсальные представления о механизмах возникновения и развития. Среди аутоиммунных заболеваний одно из ведущих мест по распространенности и социальным последствиям занимает рассеянный склероз. Поэтому исследования, не только добавляющие конкретные знания о биохимических реакциях, сопровождающих эту патологию, но и интегрирующие их в единые концепции и предлагающие обоснованные рекомендации по воздействиям, предотвращающим (замедляющим) развитие рассеянного склероза, крайне востребованы.

В диссертационной работе Е.С. Кузиной проведено систематическое изучение процессов, сопровождающих протеасомный гидролиз основного белка миелина, и показана взаимосвязь этих реакций с развитием рассеянного склероза, а также сформулированы и обоснованы предложения по новым препаратам, потенциально эффективным при терапии этого заболевания. Как следует из вышеизложенного, поставленные в данной работе задачи характеризуются несомненной актуальностью и практической значимостью.

Подготовленная Е.С. Кузиной диссертация отражает проведенные ей работы по изучению роли протеасомного гидролиза основного белка миелина в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита – общепризнанной лабораторной

модели рассеянного склероза. Материалы диссертации свидетельствуют о решении фундаментальных задач по анализу механизмов протеасомной убиквитин-независимой деградации белков и вносят существенный вклад в прояснение этиологии и патогенеза рассеянного склероза. Таким образом, материалы диссертации свидетельствует об успешном достижении поставленной цели исследования.

Диссертационная работа Е.С. Кузиной построена по традиционной схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, изложения результатов и их обсуждения, материалов и методов, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 110 страницах, содержит 35 рисунков и 4 таблицы. В библиографии диссертации представлено 187 источников.

Во вводной части диссертации кратко описывается патогенез рассеянного склероза и основные представления о связи этого заболевания с аутоиммунными процессами и с вызываемым ими протеолитическим нарушениям миелинового покрытия аксонов. Подготовленный Е.С. Кузиной литературный обзор вводит все понятия, необходимые для рассмотрения молекулярных и клеточных механизмов аутоиммунных процессов при рассеянном склерозе, и отражает современный уровень исследований этих механизмов. Подробно рассмотрены структура протеасом и иммунопротеасом, основы их каталитического действия. Описана роль убиквитинилирования в модуляции действия протеаз на белки, утратившие нативную структуру. Обсуждаются гидролитические процессы в протеасомах, функции образующихся при этом белковых фрагментов разной длины. Показана взаимосвязь протеолиза в иммунопротеасомах и индукции аутоиммунного ответа, рассмотрены современные научные представления о механизмах, обеспечивающих эту взаимосвязь.

Проанализировав молекулярные и субклеточные основы изучаемых процессов, диссертант переходит к рассмотрению этиологии рассеянного склероза. В соответствии с этим в литературном обзоре диссертации далее характеризуется аутоиммунная природа заболевания и участие Т-клеток в развитии патологических процессов. Убедительно обосновывается применение экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита в качестве лабораторной модели рассеянного склероза. Представлена аргументация, свидетельствующая о том, что ключевой мишенью патологических воздействий при этих двух заболеваниях является основной белок миелина. Описаны локализация и функциональное значение данного белка. Рассмотрены исследования предшественников, в которых изучались различные аспекты деструкции основного белка миелина при рассеянном склерозе и экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите. В конце литературного обзора автор приводит классификацию существующих средств,

используемых для терапии рассеянного склероза, и комментирует молекулярные механизмы их действия.

Анализ литературы проведен Е.С. Кузиной на высоком уровне и дает адекватное представление о современном состоянии дел по проблематике работы. Рассмотрено значительное число публикаций (141 ссылка), включая результаты исследований последних лет. Материал хорошо структурирован и четко изложен, охарактеризованные понятия и концепции формируют эффективный инструментарий для дальнейшего обсуждения результатов диссертационной работы. Приведенные в обзоре сведения об аутоиммунных процессах при рассеянном склерозе и протеасомной деструкции основного белка миелина позволяют содержательно интерпретировать получаемые автором данные, оценивать их значимость и новизну. В целом литературный обзор свидетельствует о высокой квалификации Е.С. Кузиной в области биоорганической химии.

В разделе «Результаты и обсуждение» представлен логически структурированный большой цикл экспериментов, начинающийся с подтверждения убиквитин-независимого характера разрушения основного белка миелина протеасомами и завершающийся оценкой на животной модели нового средства для терапии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, выбор которого основан на установленных диссертантом закономерностях молекулярных процессов, лежащих в основе заболевания.

В ходе выполнения работы Е.С. Кузиной получен ряд новых научных результатов. Обнаружен и охарактеризован гидролиз основного белка миелина 26S протеасомой по убиквитин-независимому пути. Продемонстрирован рост содержания каталитических иммуносубъединиц протеасомы в центральной нервной системе мышей с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом. Охарактеризован состав пептидов, образующихся при гидролизе основного белка миелина иммунопротеасомой. Показаны отличия пептидных профилей у здоровых мышей и мышей с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом. В качестве одного из основных регуляторных пептидов, в повышенных количествах образующихся при патологическом протеолизе, выделен восьмизвенный пептид MBP83-90 [ENPVVHFF]. Установлено, что Т-клетки, специфичные к данному пептиду, лизируют олигодендроциты, обработанные гамма-интерфероном. Предложенный диссертантом ингибитор иммуносубъединицы протеасомы вызывает достоверное снижение тяжести аутоиммунного энцефаломиелита у лабораторных животных.

Значимость для науки и производства полученных данных и установленных закономерностей определяется как выявлением закономерностей убиквитин-независимого гидролиза, осуществляемого протеасомами, так и формированием существенного задела

для дальнейшего выбора наиболее эффективных средств терапии аутоиммунных заболеваний центральной нервной системы. Несомненно целесообразность продолжения исследований модуляторов иммунопротеасомного гидролиза основного белка миелина и оценки их терапевтического потенциала против рассеянного склероза, основанной на установленных Е.С. Кузиной закономерностях.

В разделе «Материалы и методы» представлен крайне разнообразный научно-методический инструментарий, использованный диссертантом при проведении исследования. Применявшиеся в работе методы включали денатурирующий и неденатурирующий электрофорез, иммуноблоттинг, иммунопреципитацию, трансфицирование культур эукариотических клеток методом липофекции, получение активированных CD8⁺ Т-клеток и определение их цитотоксической активности, работы по индукции экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у животных, иммуноцитохимические эксперименты, иммуногистохимию, выделение и очистку протеасом, их фракционирование ультрацентрифугированием, выделение, ацетилирование и деиминирование основного белка миелина, *in vitro* убиквитинилирование, гидролиз белков протеасомными препаратами, расчет кинетических параметров ингибирования протеасом, тандемный хромато-масс-спектрометрический анализ, масс-спектрометрию высокого разрешения с электроспрейной ионизацией, масс-спектрометрию с хроматографическим мониторингом множественных реакций, биосенсорный анализ с регистрацией поверхностного плазмонного резонанса, изучение динамики патологических процессов при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите.

Данный ряд методов полностью соответствует поставленным в диссертационной работе задачам, отражает современный уровень молекулярно-биологических, биохимических и иммунологических исследований, дает возможность получать наиболее информативные данные и корректно проверять выдвигаемые в работе гипотезы. Использованные методы подробно описаны, что позволяет однозначно интерпретировать получаемые результаты. В целом раздел «Материалы и методы» в сочетании с ранее представленными результатами свидетельствует о высокой экспериментальной квалификации Е.С. Кузиной в области биоорганической химии.

Материалы исследования логично и последовательно изложены в подготовленной диссертации и ее автореферате. Результаты каждого раздела диссертационной работы дополняют и логически развивают положения, установленные автором ранее. Использованный при обработке экспериментальных данных математический аппарат обеспечивает достоверность интерпретации результатов исследования. Описываемые эффекты и закономерности подтверждены корректно спланированными контрольными

экспериментами. Формулируемые выводы обоснованы, логично вытекают из экспериментальных данных, полностью соответствуют целям и задачам исследования. Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнения.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1. Из денситограмм на рис. 20, Б следует скачкообразное уменьшение содержания нативного белка на временном интервале между 2 и 4 часами, тогда как в первые 2 часа снижение минимально или вовсе отсутствует. При этом в опыте, представленном на рис. 20, А, содержание основного белка миелина убывает без лаг-периода. Текст диссертации не содержит предлагаемого автором объяснения этих отличий в кинетических зависимостях.
2. При сопоставлении гидролиза основного белка миелина протеасомами, выделенными из разных мышечных линий, автор наблюдает значительные отличия в суммарном количестве продукта (см. рис. 25, В). В этой связи оправданным было бы включение в диссертацию дополнительного комментария о том, как выбиралось время протеолиза, почему выбранный протокол считается наиболее информативным и рекомендуемым для дальнейшего количественного сопоставления в экспериментах с ^{18}O .

Вышеизложенные соображения имеют частный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту диссертации, и не снижают ее общую положительную оценку.

Результаты работы представлены научному сообществу на шести российских и международных конференциях; основные положения и выводы опубликованы в пяти статьях в журналах, рекомендованных ВАК РФ. В виде публикаций и докладов представлены все результаты диссертации. Содержание диссертационной работы в полной мере соответствует специальности 02.00.10 – биорганическая химия. Содержание автореферата соответствует основным идеям и выводам диссертационной работы, полно и адекватно отражает результаты выполненного исследования.

Е.С. Кузиной выполнена научно-квалификационная работа, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для развития биорганической химии: изучена роль протеасомного гидролиза основного белка миелина в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита.

Диссертация Е.С. Кузиной «Убиквитин-независимый протеолиз основного белка миелина и его роль в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита» по актуальности темы, объему проведенных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов является законченной работой высокого

теоретического и экспериментального уровня. Диссертационная работа Е.С. Кузиной полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям и изложенным в пунктах 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09 2013 г. № 842 (в редакции Постановления Правительства РФ от 30.07 2014 г. № 723), а ее автор, безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Доктор химических наук, профессор

 Б.Б. Дзантиев

Заведующий лабораторией иммунобиохимии
Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН.

Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, лаборатория иммунобиохимии.

Почтовый адрес: ФИЦ Биотехнологии РАН, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, 119071, Москва, Россия

Телефон: (495)954-31-42.

Адрес электронной почты: dzantiev@inbi.ras.ru



Подпись руки Б.Б. Дзантиева заверяю:

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН,
канд. биол. наук

А.Ф. Орловский

«27» апрель 2016 г.