

## 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»**

Представления об иммунитете, молекулярных и клеточных системах, участвующих в его реализации, активно развиваются и расширяются. Адекватное изложение механизмов, участвующих в обеспечении индукции и регуляции иммунного ответа, требует построения схем с десятками участников и сложными взаимоотношениями между ними. Однако, несмотря на рост массива имеющихся знаний, представления о природе различных патологий иммунной системы не упрощаются. Предлагаемые объяснения дисфункций и потенциальных терапевтических воздействий в большинстве случаев базируются на локальном изучении одного из участников регуляторных взаимодействий и не гарантируют эффективной реализации в *in vivo* системах. К таким сложным патологиям с непроясненными механизмами возникновения и развития относятся аутоиммунные заболевания, среди которых по распространенности и социальным последствиям одно из ведущих мест 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 развитие заболевания, крайне востребованы.

В диссертационной работе проведено систематическое изучение процессов, сопровождающих протеасомный гидролиз основного белка миелина, и показана взаимосвязь этих реакций с развитием рассеянного склероза, а также представлены предложения по новым потенциальным терапевтическим агентам. Как следует из вышеизложенного, поставленные в данной работе задачи характеризуются несомненной актуальностью и практической значимостью.

Подготовленная диссертация отражает объем проведенных работ 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 исследования, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 110 страницах, содержит 4 таблиц и 35 рисунков. В библиографии диссертации представлено 187 источников.

Во вводной части диссертации кратко описывается патогенез рассеянного склероза и основные представления об аутоиммунном характере этого заболевания, сопровождающегося нарушением миелинового покрытия аксонов вследствие протеолиза основного белка миелина.

Подробный литературный обзор вводит все понятия, необходимые для рассмотрения молекулярных и клеточных механизмов аутоиммунных процессов при рассеянном склерозе, и описывает современный уровень исследований этих механизмов. Подробно рассмотрены структура протеасом и иммунопротеасом, молекулярные основы их каталитического действия. Описано использование убиквитинилирования для направленного действия протеаз на белки, утратившие нативную структуру. Обсуждается глубина гидролиза белков в протеасомах, функции получаемых фрагментов разной длины, взаимосвязь протеолиза в иммунопротеасомах и индукции аутоиммунного ответа. Существенное внимание уделяется рассмотрению этиологии рассеянного склероза, аутоиммунному характеру этого заболевания и участию Т-клеток в развитии патологических процессов. Охарактеризованы возможности применения экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита в качестве лабораторной модели рассеянного склероза. В качестве ключевой мишени патологического действия иммунной системы при этих двух заболеваниях обоснованно выделяется основной белок миелина, описывается его функциональное значение и локализация. Рассмотрены исследования предшественников, в которых изучались различные аспекты деструкции основного белка миелина при рассеянном склерозе и экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите. В заключении литературного обзора автор приводит классификацию существующих средств, используемых для терапии рассеянного склероза, и комментирует молекулярные механизмы их действия.

Анализ литературы проведен диссертантом на высоком уровне и дает адекватное представление о современном состоянии дел по проблематике работы. Рассмотрено значительное число публикаций, включая результаты исследований последних лет. Материал хорошо структурирован и четко изложен, охарактеризованные исследования

охватывают весь ряд вопросов, которые впоследствии возникают при обсуждении результатов диссертационной работы. Приводимые в обзоре сведения 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 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 процесс гидролиза 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. Показано отличие пептидных профилей для 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]. Показано, что Т-клетки, специфичные к данному пептиду, лизируют олигодендроциты, обработанные гамма-интерфероном. Предложенный диссертантом ингибитор иммуносубъединицы протеасомы вызывает достоверное снижение тяжести заболевания у лабораторных животных.

Значимость для науки и производства полученных Е.С. Кузиной данных и установленных закономерностей определяется как выявлением закономерностей убиквитин-независимого гидролиза, осуществляемого протеасомами, так и формированием существенного задела для дальнейших исследований и выбору наиболее эффективных средств против аутоиммунных заболеваний центральной нервной системы. Несомненна целесообразность продолжения исследований модуляторов иммунопротеасомного гидролиза основного белка миелина и оценки их терапевтического потенциала против рассеянного склероза на основании закономерностей, установленных Е.С. Кузиной.

В разделе «Материалы и методы» представлен крайне разнообразный научно-методический инструментарий, использованный при проведении исследования: денатурирующий и неденатурирующий электрофорез, иммуноблоттинг,

иммунопреципитацию, трансфицирование культур эукариотических клеток методом липофекции, получение активированных CD8<sup>+</sup> 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 с использованием различных средств, подавляющих гидролиз основного белка миелина протеасомой.

Данный ряд методов полностью соответствует поставленным в диссертационной работе задачам, отражает современный методический уровень молекулярно-биологических, биохимических и иммунологических исследований, дает возможность получать наиболее информативные данные и проводить корректные проверки выдвигаемых в работе гипотез. Использованные методы описаны с высокой степенью подробности, что позволяет однозначно интерпретировать получаемые результаты и свидетельствуют о высокой квалификации диссертанта как экспериментатора в области биоорганической химии.

Материалы исследования логично и последовательно изложены. 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. В целом обоснованность и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнения.

При ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы и замечания.

1. Канонические модели деструкции протеасомами и иммунопротеасомами собственных белков логично описывают взаимодействие с растворимыми – распределёнными в объеме – белками. Однако в случае демиелинизации нейронов разрушению подвергаются белки, фиксированные в составе липид-белковых комплексов на

поверхности клеточных отростков, что потенциально осложняет захват целевых белков при их фрагментации. Поэтому, переходя от общей модели протеасомной деструкции к рассмотрению основного белка миелина, было бы полезно прокомментировать особенности взаимодействия протеасом с иммобилизованными белками.

2. Диссертант рассматривает в качестве потенциального терапевтического средства ингибиторы протеасомы. Однако рассмотренные в исследовании ингибиторы, хотя и по-разному действуют на разные субъединицы протеасомы и разные виды ее каталитической активности, не обладают уникальной селективностью – способностью к блокировке исключительно деструкции основного белка миелина. То есть, защищая от патологического процесса, ингибиторы будут также угнетать естественные защитные процессы, осуществляемые протеасомами и связанные с протеолизом других белков организма. Имеются ли оценки – например, для других терапевтических препаратов со сходным механизмом действия – подтверждающие, что положительный терапевтический эффект будет превалировать над общим супрессивным действием?
3. 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. Как можно объяснить эти эффекты?
4. 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 неясно, как выбиралось время протеолиза, почему выбранный протокол считается наиболее информативным и рекомендуемым для дальнейшего количественного сопоставления в экспериментах с  $^{18}\text{O}$ . Интересно также сопоставить каталитические активности протеасом из трех источников по данным рис. 25, В и рис. 28.

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 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 биоорганической 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 – биоорганическая химия.

Доктор химических наук, профессор

Б.Б. Дзантиев

Заместитель директора по научной работе,  
заведующий лабораторией иммунобиохимии  
Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (ИНБИ РАН).

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук (ИНБИ РАН).  
Почтовый адрес: ИНБИ РАН, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, 119071, Москва, Россия  
Телефон: (495)954-31-42.  
Адрес электронной почты: [dzantiev@inbi.ras.ru](mailto:dzantiev@inbi.ras.ru)

Подпись руки Б.Б. Дзантиева заверяю

Ученый секретарь ИНБИ РАН,  
канд. биол. наук



А.Ф. Орловский

«12» мая 2015 г.