



Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@imb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

13.05.2015 № 12312-9314

На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
Академик

А.А. Макаров

2015 г.



О Т З Ы В

ведущей организации о диссертационной работе Кузиной Екатерины Сергеевны «Убиквитин-независимый протеолиз основного белка миелина и его роль в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - "биоорганическая химия".

Рассеянный склероз (РС) – одно из наиболее социально и экономически значимых неврологических заболеваний современности. Особенностью РС является возникновение заболевания в основном у лиц среднего возраста, то есть молодой и трудоспособной части населения, ведущей активную социальную жизнь. Последствия заболевания за 10-15 лет приводят практически к полной потере трудоспособности, а при недостаточно эффективном и своевременном лечении – и к летальному исходу. В мире насчитывается около 2.5 миллионов человек с данной патологией, к сожалению, приходится констатировать, что 10% больных составляют граждане Российской Федерации. Среди причин развития заболевания выделяют генетическую предрасположенность,

климатические условия местности, а также вирусные или бактериальные инфекции. Пробелы в знании этиологии РС приводят к отсутствию эффективной терапии данного заболевания. Дальнейшее совершенствование существующих подходов или же разработка новых перспективных методов терапии РС является задачей первостепенной важности. Учитывая вышесказанное, актуальность темы представленной диссертационной работы сомнений не вызывает.

Необходимость изучения протеолиза основного белка миелина связана с тем, что он является одним из основных аутоантигенов, на которые направлен иммунный ответ при рассеянном склерозе, а также его экспериментальной животной модели – экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE). Изучение протеолитической деградации аутоантигенов имеет важное значение для современной биохимии и иммунологии, в особенности для понимания молекулярных механизмов патогенеза аутоиммунных заболеваний и выявления новых терапевтических мишеней. Пептиды, образующиеся в результате протеолиза внутриклеточных антигенных белков, презентуются на поверхности клетки на молекулах главного комплекса гистосовместимости I класса и могут распознаваться цитотоксическими Т-лимфоцитами, что приводит к уничтожению таргетной клетки. Ключевую роль в протеолизе внутриклеточных белков до антигенных пептидов играет протеасома – многосубъединичный белковый комплекс, обладающий широкой субстратной специфичностью. Качественный и количественный состав пептидов, презентуемых на поверхности клетки, во многом зависит от каталитических свойств протеасомы. Механизм деградации протеасомой одного из основных аутоантигенов при РС и EAE – основного белка миелина (myelin basic protein, MBP) – и особенности протекания этого процесса в норме и при развитии аутоиммунных патологий ЦНС до сих пор не были изучены. В связи с этим диссертантом в данной работе была поставлена задача изучения роли протеасомного гидролиза MBP в развитии EAE.

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, результатов исследования и их обсуждения, экспериментальной части, включающей описание методов исследования, выводов. Автор представил обширный литературный обзор, состоящий из двух основных частей: характеристики аутоиммунного заболевания рассеянный склероз, как с молекулярно-биологической, так и клинической точек зрения, а также описания функций и строения протеасомы. Обзор написан четко, логично и подготавливает читателя к пониманию выполненной работы.

Наибольший интерес представляет глава результаты и обсуждение. В первой части работы диссертантом проведено изучение необходимости модификации убиквитином для

гидролиза MBP протеасомой *in vitro* и *in vivo*. В клетках линии HEK293 котрансфекция как UbK0, так и E1 siRNA к E1 блокировала протеасомальный гидролиз белка с-Мус и способствовала его накоплению, в то время как протеолиз ODC протеасомой в этих условиях не изменялся по сравнению с контрольной трансфекцией. MBP подвергался протеолизу с одинаковой скоростью во всех условиях, что свидетельствует об отсутствии необходимости в модификации MBP убиквитином для его гидролиза протеасомой. Интересно, что протеолиз MBP протеасомой *in vitro* эффективно подавлялся рядом белков. Ни тетраубиквитин, ни моноубиквитин не влияли на скорость гидролиза MBP протеасомой, что позволяет автору предположить, что взаимодействие MBP с убиквитин-связывающими доменами 19S регуляторной субчастицы не является необходимым для его протеасомного гидролиза. Присутствие GST, BSA или лизоцима не влияло на скорость гидролиза MBP, в то время как актин, кальмодулин, гистон H1.3 и глатирамера ацетат (GA) ингибировали протеолиз MBP протеасомой.

Вторая часть работы посвящена доказательству физиологической значимости деградации MBP иммунопротеасомой. Автору удалось показать, что содержание иммуносубъединиц протеасомы во всех отделах головного мозга значительно повышается у мышей линии SJL при развитии ЕАЕ. Дальнейшее изучение локализации $\beta 1i$ и $\beta 5i$ в ЦНС мышей с ЕАЕ, показало, что $\beta 1i$ накапливается в олигодендроцитах - резидентных клетках ЦНС, а $\beta 5i$ скорее всего привносится в ЦНС извне Т-клетками, проникающими через поврежденный гематоэнцефалический барьер. Используя оригинальную методику протеолиза MBP в воде, содержащей нуклид кислорода ^{18}O , автору удалось продемонстрировать, что количество двух пептидов MBP, DTGILDSL (MBP₃₃₋₄₀) и ENPVVHFF (MBP₈₃₋₉₀) увеличивалось в 10 раз при гидролизе MBP протеасомой из мозга ЕАЕ SJL в сравнении с гидролизом MBP протеасомой из мозга мышей линии BALB/c. При этом данные по пептиду MBP₈₃₋₉₀ были подтверждены с использованием изотпно-меченного пептида. Важно, что автору удалось продемонстрировать эффект прямой загрузки этого пептида на МНС класса I гаплотипа H-2^s. Одним из наиболее значимых результатов является наблюдение специфического лизиса олигодендроцитов цитотоксическими ENPVVHFF-реактивными Т-лимфоцитами, при этом важно, что его эффективность значительно увеличивалась в случае олигодендроцитов, обработанных интерфероном-гамма. Логичным завершением работы была успешная попытка терапии ЕАЕ $\beta 1i$ -специфический пептидилэпоксикетоном.

При очевидном и исчерпывающем экспериментальном подтверждении высказанных выводов, к работе возможно сформулировать несколько вопросов и замечаний.

1. Возможно ли показать не только накопление MBP в первичной культуре олигодендроцитов под действием PS-341, но и его протеолиз протеасомой при добавлении циклогексимида?
2. Интересным дополнением к полученным результатам была бы демонстрация непосредственного взаимодействия МНС класса I гаплотипа H-2^S с пептидом ENPVVHFF, например с применением SPR.
3. В качестве потенциально значимого методического контроля можно рассмотреть гидролиз MBP одним и тем же препаратом протеасомы в H₂¹⁸O/ H₂¹⁶O с последующим LS-ESI анализом.

Заключение

Диссертация Кузиной Екатерины Сергеевны «Убиквитин-независимый протеолиз основного белка миелина и его роль в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита» выполнена на высоком методическом уровне и в целом является завершенным фундаментальным исследованием. Содержание материалов диссертационной работы достаточно полно отражено в публикациях Кузиной Е.С. Выводы обоснованы и хорошо проиллюстрированы материалами автореферата. Автореферат отражает основное содержание диссертации. В целом, диссертационная работа Кузиной Е.С. представляет собой научно-квалификационную работу, в которой содержится решение важной фундаментальной задачи – изучения убиквитин-независимости гидролиза MBP конститутивной протеасомой и иммунопротеасомой и роли данного процесса в развитии аутоиммунных патологий ЦНС.

Данные, полученные автором, докладывались на российских и международных конференциях и полностью опубликованы в рецензируемых научных журналах. Они могут быть использованы научными группами ряда ведущих институтов РАН, – Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки: Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Института биохимии имени А.Н. Баха, Института белка РАН, Института цитологии и генетики СО РАН и др., а также для биомедицинских исследований, направленных, например, на поиск и разработку новых подходов к терапии аутоиммунных заболеваний. Работа полностью соответствует требованиям, изложенным в пунктах 9-14 Постановления правительства РФ "О порядке присуждения ученых степеней" №842 от 24 сентября 2013, а сам автор, безусловно, достоин присуждения ему искомой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - "Биоорганическая химия".

Отзыв на диссертационную работу Кузиной Екатерины Сергеевны заслушан и одобрен на заседании Лаборатории регуляции внутриклеточного протеолиза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук 25 апреля 2015 г., протокол № 7.

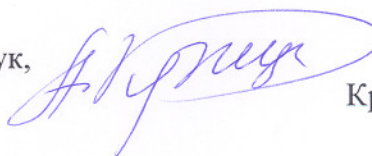
Зав. лабораторией регуляции внутриклеточного протеолиза
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
д.б.н., профессор



Карпов В.Л.

Подпись Карпова В.Л. удостоверяю

Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,



Крицын А.М.