

Федеральное агентство научных организаций

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ИНЦ РАН)**

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4  
тел. (812) 297-18-34, факс: (812) 297-35-41,  
эл.адрес: [cellbio@incras.ru](mailto:cellbio@incras.ru); <http://www.cytspb.rssi.ru/>

25.03.2016 № 12316-662-86

**«УТВЕРЖДАЮ»**

ВРИО директора  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Институт цитологии  
Российской академии наук



док.биол.наук  
Н.А. Михайлова

### **ОТЗЫВ**

ведущей организации на диссертационную работу **Кузиной Екатерины Сергеевны** «Убиквитин-независимый протеолиз основного белка миелина и его роль в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита», представленную к защите в диссертационный Совет Д 501.001.41 по химическим наукам при МГУ имени М.В. Ломоносова на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия.

Рассеянный склероз (РС) – одно из наиболее серьезных социально значимых аутоиммунных неврологических заболеваний современности. РС поражает в основном лиц среднего возраста, то есть молодую и трудоспособную часть населения, ведущую 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. Этиология РС до сих пор до конца не изучена, что обуславливает отсутствие эффективной терапии данного заболевания. Все большее распространение получает гипотеза «вирусной индукции» РС. Разработка новых перспективных методов терапии РС является задачей первостепенной важности. Учитывая вышесказанное, актуальность темы представленной диссертационной работы сомнений не вызывает.

При РС происходит разрушение миелиновых оболочек проводящих путей головного и спинного мозга. Миелин является одним из основных антигенов, на который направлен аутоиммунный ответ при РС, а также его животной модели – экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE).

Изучение протеолиза основного белка миелина (myelin basic protein, MBP), как основного аутоантигена при РС, представляется важным для понимания молекулярных механизмов патогенеза аутоиммунных заболеваний и выявления новых терапевтических мишеней. Пептиды, образующиеся в результате протеолиза внутриклеточных белков, презентруются на поверхности клетки на молекулах главного комплекса гистосовместимости I класса и могут распознаваться цитотоксическими Т-лимфоцитами, что приводит к уничтожению клетки-мишени. Существенную роль в процессах протеолиза внутриклеточных белков до отдельных антигенных пептидов играет протеасома – многосубъединичный белковый комплекс, обладающий широкой субстратной специфичностью. Протеасома может разрушать белки как по убиквитин-зависимому, так и убиквитин-независимому пути. Качественный и количественный состав пептидов, презентруемых на поверхности клетки, во многом зависит от каталитических свойств протеасомы. Задача изучения роли протеасом-зависимой деградации MBP в развитии ЕАЕ представляется весьма перспективной.

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, результатов исследования и их обсуждения, экспериментальной части, включающей описание методов исследования, выводов. Литературный обзор достаточно полно отражает современное состояние научных знаний в этой области. Он состоит из двух частей: 1) характеристика аутоиммунного заболевания РС, как с молекулярно-биологической, так и клинической точек зрения; 2) описание функций и строения протеасомы.

Глава результаты и обсуждение описывает саму суть работы. В первой части работы диссертантом было изучено влияние ковалентной модификации убиквитинирования на эффективность гидролиза MBP протеасомой *in vitro* и *in vivo*. Было обнаружено, что ни тетраубиквитин, ни моноубиквитин не влияли на скорость гидролиза MBP протеасомой *in vitro*, что позволило автору предположить, что взаимодействие MBP с убиквитин-связывающими доменами 19S регуляторной субчастицы не являлось необходимым для его протеасом-зависимого гидролиза. Было показано, что протеасом-зависимый протеолиз MBP *in vitro* конкурентно подавлялся такими белками как актин, кальмодулин, гистон H1.3 и глатирамера ацетат (GA), но не зависел от присутствия GST, BSA или лизоцима. Было обнаружено, что деградация MBP в клетках протекала с одинаковой скоростью в любых условиях, что свидетельствует об отсутствии необходимости в модификации MBP убиквитином для его гидролиза протеасомой.

Вторая часть работы органично связана с первой и посвящена доказательству физиологической значимости деградации MBP иммунопротеасомой. Автору удалось однозначно показать, что содержание иммуносубъединиц протеасомы во всех отделах

головного мозга значительно повышается у мышей линии SJL при развитии ЕАЕ. Дальнейшее изучение локализации каталитических субъединиц  $\beta 1i$  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 (MBP<sub>33-40</sub>) и ENPVVHFF (MBP<sub>83-90</sub>) увеличивалось в 10 раз при гидролизе MBP протеасомой из мозга мышей линии SJL, развивающих ЕАЕ, в сравнении с гидролизом MBP протеасомой из мозга мышей линии BALB/c. Также важно отметить тот факт, что диссертанту удалось продемонстрировать загрузку этого пептида на МНС класса I гаплотипа H-2<sup>s</sup>. Соответственно, наблюдался специфический лизис олигодендроцитов цитотоксическими ENPVVHFF-реактивными Т-лимфоцитами, особенно после обработки олигодендроцитов интерфероном гамма, который вызывает повышенную экспрессию  $\beta 1i$ . Логичным завершением работы была успешная попытка терапии ЕАЕ  $\beta 1i$ -специфическим пептидилэпоксикетоном. Этот этап дает право надеяться на возможность поиска специфических терапевтических препаратов, направленных на иммунопротеосому.

При очевидном и исчерпывающем экспериментальном подтверждении высказанных выводов, к данной работе возникает несколько вопросов и замечаний.

1. В качестве потенциально значимого методического контроля можно рассмотреть гидролиз MBP в  $H_2^{18}O/H_2^{16}O$  одним и тем же препаратом протеасомы с последующим анализом электроспрейной масс-спектрометрией (LC-ESI-MS/MS).
2. Рис.3 В и 3Г – не очень убедительно выглядит контроль на с-тус и ODC
3. Рис 4А. Интересно было бы оценить пептидазные активности 26S протеасом, выделенных из головного мозга крыс.
4. Рис 6А. Для наглядности стоило бы добавить схему отделов головного мозга мыши и указать схематично те отделы, которые были исследованы.
5. Было ли ожидаемо, что во всех отделах головного мозга значительно повышается содержание иммуносубъединиц протеасом у мышей линии SJL при развитии ЕАЕ или, исходя, из литературных данных, ожидалась разница в содержании иммунных протеасом в различных отделах?
6. Рис 12 Б. Малая интерферирующая РНК siRNA против субъединицы  $\beta 1i$  показала низкую эффективность в подавлении экспрессии, поэтому желательно было бы использовать несколько независимых siRNA.

## Заключение

Диссертация Кузиной Екатерины Сергеевны «Убиквитин-независимый протеолиз основного белка миелина и его роль в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита» выполнена на высоком методическом уровне и в целом является завершённым фундаментальным исследованием. На основании полученных в работе данных можно сделать предположение о роли убиквитин-независимого гидролиза МВР иммунопротеасомой в развитии аутоиммунных патологий ЦНС. Рассеянный склероз и ЕАЕ характеризуются повреждением гематоэнцефалического барьера и развитием воспаления в ЦНС, что приводит к активному транспорту аутореактивных лимфоцитов в ЦНС. Секретируемые ими провоспалительные цитокины, в частности интерферон-гамма, взаимодействуют с соответствующими рецепторами на поверхности олигодендроцитов и посредством сигнальных каскадов активируют экспрессию в этих клетках иммуносубъединицы протеасомы  $\beta 1i$ . Под действием иммунопротеасомы образуется повышенное количество пептида МВР83-90 [ENPVVHFF], который в контексте МНС I эффективно распознаётся CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами. Непосредственное взаимодействие олигодендроцитов с эффекторными клетками, обусловленное этими событиями, приводит к их гибели, разрушению миелиновой оболочки и, как следствие, нарушению проведения нервного импульса.

Данные, полученные автором, докладывались на российских и международных конференциях и полностью опубликованы в рецензируемых научных журналах и могут быть использованы научными группами ряда ведущих институтов РАН – Федеральных государственных бюджетных учреждений науки: Институте молекулярной биологии имени В.А.Энгельгардта РАН, Институте биохимии имени А.Н.Баха РАН, Институте белка РАН, Институте 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 ВАК, изложенным в пунктах 9-14 Постановления Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» №842 от 24 сентября 2013 г., 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 экспрессии генов Федерального

государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии РАН 18 марта 2016 года, протокол №3.

Заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
науки Института цитологии РАН  
Доктор биологических наук



Барлев Н.А.

Подпись Барлева Н.А. удостоверяю

Ученый секретарь Федерального государственного  
бюджетного учреждения  
науки Института цитологии РАН, к.б.н.



Тюряева И.И.

194064, СПб, Тихорецкий пр. 4  
Институт цитологии РАН,  
Email: [cellbio@incras.ru](mailto:cellbio@incras.ru)  
Тел: (812)297-18-34

Федеральное агентство научных организаций  
(ФАНО России)

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки

**Институт цитологии  
Российской академии наук  
(ИНЦ РАН)**

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4  
тел. (812) 297-18-34, факс: (812) 297-03-41

ИНН 7802030531, КПП 780201001  
УФК по г. Санкт-Петербургу  
(Отдел № 3, ИНЦ РАН), л/с 20726Ц41010,  
Северо-Западное ГУ Банка России  
р/с 40501810300002000001, БИК 044030001

25.03.2016 № 12316-662-86

Председателю  
Диссертационного совета Д 501.001.41  
при Московском государственном  
университете им. М.В.Ломоносова  
академику

**А.А.Богданову**

от **Михайловой** Натальи Аркадьевны

На ваш запрос от 10.02.2016

В связи с защитой кандидатской диссертации **Е.С.Кузиной** на тему: «Убиквитин-независимый протеолиз основного белка миелина и его роль в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита», представленной на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности «Биоорганическая химия», **согласна** на включение в аттестационное дело и дальнейшую обработку моих персональных данных, необходимых на основании нормативных документов Правительства, Минобрнауки и ВАК, на размещение их в том числе в сети Интернет на сайте ВАК, в единой информационной системе.

ВРИО директора Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки

Институт цитологии Российской академии наук

доктор биологических наук по специальности  
«Зоология» (03.02.04)

доцент по специальности «Клеточная биология,  
цитология, гистология» (03.03.04)



Н.А.Михайлова

### Сведения о ведущей организации

по диссертации Кузиной Екатерины Сергеевны «Убиквитин-независимый протеолиз основного белка миелина и его роль в развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита», представленной к соисканию ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - "Биоорганическая химия".

Полное наименование организации в соответствии с уставом	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук
Сокращенное наименование организации в соответствии с уставом	ИНЦ РАН
Ведомственная принадлежность	Федеральное агенство научных организаций
Место нахождения	г. Санкт-Петербург
Почтовый индекс, адрес организации	Тихорецкий проспект 4, Санкт-Петербург, 194064, Россия
Адрес официального сайта в сети Интернет	<a href="http://www.cytspb.rssi.ru">http://www.cytspb.rssi.ru</a>
Телефон	+7(812)297-18-29 +7(812)297-18-34
Адрес электронной почты	<a href="mailto:cellbio@incras.ru">cellbio@incras.ru</a>
Список публикации сотрудников ведущей организации по теме диссертации соискателя в рецензируемых научных изданиях за последние 5 лет (не более 15 публикаций)	<p>1. Lezina L, Purmessur N, Antonov AV, Ivanova T, Karpova E, Krishan K, Ivan M, Aksenova V, Tentler D, Garabadgiu AV, Melino G, Barlev NA.</p> <p>miR-16 and miR-26a target checkpoint kinases Wee1 and Chk1 in response to p53 activation by genotoxic stress. Cell Death Dis. 2013 Dec 12;4:e953. doi: 10.1038/cddis.2013.483. (<a href="http://www.nature.com/cddis/journal/v4/n12/full/cddis2013483a.html">http://www.nature.com/cddis/journal/v4/n12/full/cddis2013483a.html</a>) IF=6.04</p> <p>2. Marouco D, Garabadgiu AV, Melino G, Barlev NA.</p> <p>Lysine-specific modifications of p53: a matter of life and death?</p>

Oncotarget. 2013 Oct;4(10):1556-71.  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3858545/>)IF=6.64

3. Moiseeva TN, Bottrill A, Melino G, Barlev NA.

DNA damage-induced ubiquitylation of proteasome controls its proteolytic activity.

Oncotarget. 2013 Sep;4(9):1338-48.  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3824523/>)IF=6.64

4. Antonov AV, Krestyaninova M, Knight RA, Rodchenkov I, Melino G, Barlev NA.

PPISURV: a novel bioinformatics tool for uncovering the hidden role of specific genes in cancer survival outcome.

Oncogene. 2013 May 20. doi: 10.1038/onc.2013.119.  
[Epub ahead of print](<http://www.nature.com/onc/journal/vaop/ncurrent/full/nc2013119a.html>) IF=7.36

5. Aksenova V, Turoverova L, Khotin M, Magnusson KE, Tulchinsky E, Melino G, Pinaev GP, Barlev N, Tentler D.

Actin-binding protein alpha-actinin 4 (ACTN4) is a transcriptional co-activator of RelA/p65 sub-unit of NF-kB.

Oncotarget. 2013 Feb;4(2):362-72.  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3712580/>)IF=6.64

6. Antonov AV, Knight RA, Melino G, Barlev NA, Tsvetkov PO.

MIRUMIR: an online tool to test microRNAs as biomarkers to predict survival in cancer using multiple clinical data sets.

Cell Death Differ. 2013 Feb;20(2):367. doi: 10.1038/cdd.2012.137. Epub 2012 Nov 23.  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3554>



342/)IF=8.37

7. Malatesta M, Peschiaroli A, Memmi EM, Zhang J, Antonov A, Green DR, Barlev NA, Garabadgiu AV, Zhou P, Melino G, Bernassola F.

The Cul4A-DDB1 E3 ubiquitin ligase complex represses p73 transcriptional activity.

Oncogene. 2013 Sep 26;32(39):4721-6. doi: 10.1038/onc.2012.463. Epub 2012 Oct 22. (<http://www.nature.com/onc/journal/v32/n39/full/onc2012463a.html>)IF=7.36

8. Foster CT, Dovey OM, Lezina L, Luo JL, Gant TW, Barlev N, Bradley A, Cowley SM. Lysine-specific demethylase 1 regulates the embryonic transcriptome and CoREST stability. Mol Cell Biol. 2010 Oct;30(20):4851-63. doi: 10.1128/MCB.00521-10. Epub 2010 Aug 16.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2950538/>)IF=5.37

9. Kulichkova VA, Tsimokha AS, Fedorova OA, Moiseeva TN, Bottril A, Lezina L, Gauze LN, Konstantinova IM, Mittenberg AG, Barlev NA.

26S proteasome exhibits endoribonuclease activity controlled by extra-cellular stimuli.

Cell Cycle. 2010 Feb 15;9(4):840-9. Epub 2010 Mar 2. (<https://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/10829/>)IF=5.4

10. Barlev NA, Sayan BS, Candi E, Okorokov AL.

The microRNA and p53 families join forces against cancer.

Cell Death Differ. 2010 Feb;17(2):373-5. doi: 10.1038/cdd.2009.73. (<http://www.nature.com/cdd/journal/v17/n2/full/cdd200973a.html>) IF=8.37

“Верно”

Федеральное бюджетное учреждение науки

Институт цитологии

Ученый секретарь Института цитологии РАН, к.б.н.

И.И. Тюряева



“25” мар 2016 года