

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Михайловой Елены Радиславовны на тему «Роль фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в межклеточном переносе патогенных белковых комплексов в клеточной модели Болезни Хантингтона», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

1. Актуальность темы диссертации

В формулировке автора, нейродегенеративные заболевания, как правило, связаны с накоплением внеклеточных или внутриклеточных агрегатов мутантных белков. Олигомеры и агрегаты, образующиеся при развитии патологии, являются причиной смерти нейронов в областях мозга, специфических для каждого заболевания. По мере прогрессирования заболевания агрегаты патогенных белков появляются в других регионах мозга, зона поражения расширяется, гибнут новые нейроны в соседних структурах мозга. И, как считает автор, в последние годы обнаружено явление горизонтального переноса, в ходе которого белковые агрегаты проникают в нативные клетки через плазматические мембраны и изменяют конформацию нормальных белков, способствуя, таким образом, распространению заболевания подобно прионным белкам. Тем не менее, на сегодняшний день недостаточно данных о токсичности внеклеточных агрегатов, их белковом составе и участии в межклеточной миграции.

Следует отметить, что это взгляд на проблему не нейробиолога, работающего на уровне целого организма и выбирающего модель на животных в соответствии с основными требованиями к модели нейродегенеративных заболеваний (НДЗ). Так, модель должна воспроизводить три основных диагностических признака: 1. дефекты формирования памяти; 2. локомоторные нарушения; 3. амилоидо-подобные агрегаты. В данном случае это взгляд автора, современного специалиста в области клеточной биологии, цитологии, гистологии. И сама эта специализация уводит автора в совершенно другое русло рассуждений и

представлений. Так, автор пытается решить проблему так называемого «горизонтального переноса», сосредоточившись на использовании клеточных культур Болезни Хантингтона (БХ), возлагая при этом надежды на использование свойств фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД). Последнее вызвано тем, что, как автор описывает развернуто только в главе «Заключение», интерактома ГАФД включает белки мембранного транспорта белков, G-белки, Ca^{2+} -связывающие белки. Кроме того, что упомянуто также только в «Обсуждении» и «Заключении», факторы, способные связываться ГАФД и выявленные в лаборатории в процессе высокопроизводительного скрининга, спасали клетки нейробластомы в условиях окислительного стресса (Lazarev et al., 2016). Выбранные препараты, получившие названия X409 и RX426, уменьшали агрегацию ГАФД в клетках нейробластомы и понижали уровень клеточной смерти на 30%. Поэтому автор, помимо воли своей и существующего в лаборатории, где выполнена работа, взгляда на вещи, решает абсолютно другую, но очень актуальную проблему. Не ведая этого, автор в «Обсуждении» приводит одно из воззрений о том, «что же является более токсичным для клеток, несущих «мутантные» белки. Многие авторы придерживаются мнения, что наиболее токсичными являются олигомеры мутантных белков, а формирование агрегатов представляет собой защитную реакцию клетки (He et al, 2012). Т.е., согласно этой точке зрения, формирующийся агрегат собирает и инактивирует токсичные олигомеры, в результате чего олигомеры утрачивают свою токсичность (Verma et al, 2012)». Да, именно этот взгляд и подтвержден высоко-обоснованными экспериментами Михайловой Е.Р. По сути, она ведет исследования на новую и актуальную тему: Как ценой гибели одной клетки сберегается то, что может обеспечить пострадавшему при НДЗ мозгу выполнение нужной функции. Таким образом решается актуальная проблема выявления защитных функций мозга. И именно это, в дословной формулировке разделов диссертационной работы и автореферата, и приводится ниже.

2. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Цели и задачи исследования - установление роли глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в межклеточном переносе мутантного хантингтина. Исходя из этого, были поставлены следующие задачи: 1. Исследовать процесс выхода и белковый состав патогенных агрегатов мутантного хантингтина из клеток-моделей болезни Хантингтона. 2. Определить влияние вышедших комплексов ГАФД и polyQ на жизнеспособность клеток. 3. Исследовать механизмы внутриклеточного транспорта ГАФД — индивидуально и в комплексе с polyQ. 4. Определить вклад ГАФД в прион-подобную активность мутантного хантингтина. 5. Сравнить токсичность внеклеточных и внутриклеточных агрегатов комплексов polyQ-ГАФД. **Основные положения, выносимые на защиту:** 1. ГАФД высвобождается из мёртвых и повреждённых клеток в комплексе с polyQ, и эти комплексы токсичны для клеток. 2. ГАФД в комплексе с polyQ способна проникать внутрь живых клеток и усиливать агрегацию нативных белков. 3. Внеклеточные агрегаты комплексов polyQ-ГАФД более токсичны, чем их внутриклеточные аналоги.

3. Значимость полученных результатов для науки и практического применения. Конкретные рекомендации по их использованию

Как ни странно, теоретическое и практическое значение работы подчеркнуто не в одноименном разделе, а наиболее явно и четко обозначено в разделе «Выводы». Так, изучен механизм внутриклеточного транспорта комплекса polyQ-ГАФД и убедительно доказано, что этот транспорт происходит посредством клатрин-зависимого эндоцитоза. Для получения этого доказательства очень точно и направленно применен огромный арсенал молекулярно-биологических, клеточных, цитохимических и биохимических методик, часть из которых была специально разработана с участием автора работы. Тот факт, что роль эндоцитоза в функционировании многоклеточного

организма и, в особенности, нервной системы, является новым и непривычным для исследователей и определяет значимость полученных результатов для науки. Как недавно установлено, клатрин-зависимый эндоцитоз является существеннейшим клеточным процессом, вовлекающим координированную сборку и разборку на плазматической мембране клетки одновременно множества различных белков. Активную, а подчас и существеннейшую роль на ключевых стадиях клатрин-зависимого эндоцитоза играет актин, перемещающийся между цитоплазмой и ядром в комплексе с кофилином. Эти перемещения – адаптивный и быстрый ответ клетки на внешние воздействия, а поскольку их нарушения приводят к патологии НДЗ, эти болезни в последнее время называют не только болезнями укладки белков, но кофилинопатиями. Поэтому результаты диссертационной работы Михайловой Е.Р. заслуживают активной пропаганды в курсах лекций как биологических факультетов, так и медицинских институтов.

4. Степень завершенности диссертационной работы и качество ее оформления

Диссертационная работа является максимально завершенной, насколько это возможно на данном уровне исследований автора. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов работы, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 152 ссылки. Диссертация изложена на 104 страницах и иллюстрирована 24 рисунками. По теме диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus. Результаты представлены и на достаточном числе конференций.

Качество оформления имеет только один существенный недочет и обидно, что он повторяется раз по шесть уже на первой странице «Введения». Это – слитное написание слов и отсутствие первой по встречаемости, основополагающей ссылки в списке литературы (Minjarez et al, 2013).

Удовольствие от прочтения приходит только с началом изложения результатов, структурированность нарастает в «Обсуждении» и «Заключении». Обзор Литературы причиняет неудобства отсутствием структурированности, логических переходов, частым смешением причины и следствия. Поэтому из Литобзора не явствует, что и зачем следовало изучать. Кроме постоянного употребления лабораторного жаргона (мышинные и человеческие гены), «вносили в лунки манифолда в триплах», «биндеры», смущает несогласованность «ГАФД, выделенная из мышцы кролика, был любезно предоставлен». Впечатляют и нововведения – «причинные гены».

Но такого рода недочеты оформления компенсируются ясностью изложения результатов, их иллюстрациями и четкостью выводов.

5. Соответствие автореферата основным идеям и выводам диссертации

Автореферат полностью отражает содержание диссертации и наглядно свидетельствует об уровне публикаций.

6. Замечания к работе

Первое и основное замечание состоит в том, что, о устоявшемся мнении, НДЗ являются преимущественно спорадическими заболеваниями, не более 1-2 % из них имеют наследственную природу, то есть рассматриваются как семейные. Все нейродегенеративные заболевания человека полигенны, каждое из них - не болезнь, но – синдром. Уже к 2004 г в Отделе Клинической Нейрохимии факультета Психиатрии и Психотерапии Университета г. Вюрцбург, Германия (где имел честь работать и оппонент), было установлено, что как спорадические (изменчивость!), так и семейные (наследственность!) случаи Болезни Паркинсона PD характеризуются изменением экспрессии 137 генов (68 down и 69 up regulated) (Günblatt et al., 2004). Это ведет к изменению функций белков: убиквитин-протесомной системы, Теплового шока, регулируемых ионами металлов и окислительным стрессом, клеточной адгезии, цитоскелета, транспорта. Поэтому возникает

вопрос – давать ли пациенту 137 лекарств ежедневно и три раза в день или же выявить гены-хабы. В связи с этим не понятны попытки автора поочередно утверждать, что все НДЗ, и БХ в частности, ТОЛЬКО наследственные, а потом отмечать: «Как и большинство нейродегенеративных заболеваний, расстройства, обусловленные прионами, в основном носят спорадический характер, но в редких случаях наследуются». Прионы для автора становятся неким фетишем и способом объяснения прогрессирования НДЗ. Не нужно приумножать сущностей без необходимости, в лаборатории, где выполнена работа, давно показана шаперонная роль белков теплового шока (БТШ). Их функция – проверять правильность укладки вновь синтезированных белков и, если обнаружены неправильности, образовывать с ними нерастворимый комплекс и устранять их из привычного компартмента функционирования, «складируя» где-либо в другом месте. Поскольку синтез белка идет постоянно, размер агрегата неуклонно возрастает. Шаперон в переводе с французского – дама, выводящая девушку на ее первый бал и следящая за правильностью ее поведения в данном месте.

Абсолютно не понятно, почему, все время рассуждая о прионах, и даже упоминая исследования на дрожжах – Sup35, HSP104, автор не приводит ни одной ссылки ни на С.Г. Инге-Вечтомова, ни на Барбару Линдквист.

Тем не менее известно (Галкин А.П., Миронова Л.Н., Журавлёва Г.А. Инге-Вечтомов С.Г. Прионы дрожжей, амилоидозы млекопитающих и проблема протеомных сетей. // **Генетика**. - 2006. - Т. 42, №11. - С 102-141), что согласно медицинской классификации болезни, связанные с образованием межклеточных амилоидных агрегатов, принято называть «амилоидозами», тогда как патологии, которые определяются накоплением внутриклеточных амилоидов, относят к амилоидозоподобным». Также возникает вопрос, что известно автору не о традиционной «патогенности», а о нормальной, имманентной амилоидам функции? Ведь уже известно, что «некоторые амилоиды могут выполнять жизненно-важные функции, в

частности амилоидные конформеры CPEB и Orb2 регулируют долговременную память у *Aplysia californica* и *Drosophila melanogaster*». Почему же автор упускает этот момент в своих рассуждениях?

Заключение

Диссертационная работа Михайловой Елены Радиславовны. полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям: 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Официальный оппонент

Доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник,
заведующий лабораторией нейрогенетики

Федерального государственного учреждения

науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова»

Российской академии наук

Савватеева-Попова Елена Владимировна



Савватеева-Попова Е.В.
31.03.17

Адрес: 199034, г. Санкт-Петербург, наб. Макарова д.6. Федеральное государственное учреждение науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова» Российской академии наук; тел.: +7 (812) 328 13 01

e-mail: esavvateeva@mail.ru