



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»
(ФГБНУ «ИЭМ»)

ул. Академика Павлова, 12, Санкт-Петербург, 197376
телефон: +7 (812) 234-6868, факс: +7 (812) 234-9489, e-mail: iem@iemrams.ru

« 24 » 03 20 17

№ 557-УС/262

УТВЕРЖДАЮ
Врио директора
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения
"Институт экспериментальной медицины"
д.м.н., профессор
Евгений Владимирович Шайдаков



2017 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

о диссертации Михайловой Елены Радиславовны «РОЛЬ ФЕРМЕНТА
ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В МЕЖКЛЕТОЧНОМ
ПЕРЕНОСЕ ПАТОГЕННЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В КЛЕТОЧНОЙ
МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА», представляемой на соискание учёной
степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная
биология, цитология, гистология.

Актуальность избранной темы

Болезнь Хантингтона – наследственное нейродегенеративное заболевание, развивающееся при увеличении количества tandemных кодонов CAG в гене хантингтина, что приводит к образованию полиглутаминовых последовательностей и агрегатов хантингтина токсичных для клеток центральной нервной системы. Диссертационная работа Елены Радиславовны Михайловой посвящена исследованию роли глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в межклеточном переносе белковых комплексов, приводящих к развитию болезни Хантингтона. Учитывая, что в настоящее время это заболевание неизлечимо и механизмы его развития не до конца ясны, исследования патогенеза на клеточной модели актуальны как для понимания молекулярных основ развития болезни Хантингтона, так и для разработки инновационных способов терапии и скрининга

эффективности потенциальных лекарственных веществ. Сказанное выше особенно важно, если учесть, что для болезни Хантингтона, в отличие от множества других нейродегенеративных заболеваний, возможна ранняя предсказательная молекулярная диагностика, основанная на определении количества повторов CAG в гене хантингтина. Таким образом, для людей, у которых с высокой вероятностью предсказано развитие болезни Хантингтона, возможно использование профилактической терапии. В связи с этим тема диссертационной работы, связанная с разработкой подходов для регуляции развития болезни Хантингтона на клеточной модели, выбранная диссертантом, является весьма актуальной.

Структура и содержание работы

Диссертация изложена на 104 страницах машинописного текста, состоит из разделов «Список используемых сокращений» «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследований», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список цитируемой литературы», «Приложение» и «Благодарности». В разделе «Обзор литературы» рассмотрены нейродегенеративные заболевания, связанные с образованием внеклеточных и внутриклеточных агрегатов белков, отдельно рассматриваются, так называемые «полиглутаминовые заболевания», в том числе болезнь Хантингтона, описаны механизмы переноса агрегатов прионных и неприонных белков, наконец, дана характеристика фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД), который можно отнести к группе moonlighting proteins – белков с различной клеточной локализацией и множеством функций. Раздел «Материалы и методы исследования» содержит описание десятка методических подходов, использованных диссертантом: методы культивирования клеток, выявления агрегатов белков, иммуоферментного анализа, измерения ферментативной активности, проточной цитометрии, электрофореза и Вестерн-блоттинга. Кроме того, кратко описаны протоколы и источники получения ГАФД и рекомбинантных полипептидов, соответствующих фрагментам хантингтина, содержащим 23 и 58 аминокислотных остатков глутамина (Q 23 и Q58).

Раздел «Результаты» содержит описание следующих наблюдений: 1) во всех клетках феохромоцитомы крысы через 48 часов после индукции синтеза фрагмента хантингтина, содержащего 103 остатка Q, слитого с зеленым флуоресцентным белком, обнаруживаются флуоресцирующие агрегаты, включающие ГАФД, индуцирующие гибель более половины клеток, параллельно с высвобождением ГАФД в составе нерастворимых в детергенте агрегатов с polyQ; 2) кондиционированная трансформированными клетками среда, содержащая агрегаты polyQ и ГАФД, проявляет цитотоксические свойства и теряет их при

удалении агрегатов; 3) клетки нейробластомы человека SK-N-SH демонстрировали гибель при инкубации в среде, содержащей Q58, при этом ГАФД увеличивала долю погибших клеток, а также увеличивала способность Q58 проникать внутрь клеток с образованием агрегатов, содержащих ГАФД; 4) Q58 и ГАФД обладают прионоподобными свойствами, вызывая агрегацию нормального варианта хантингтина, содержащего 25 аминокислотных остатков Q; 5) с помощью ингибиторного анализа показано, что ГАФД способствует клатрин-опосредованному эндоцитозу Q58; 6) было показано, что внеклеточные агрегаты НТТQ103-ГАФД проявляют большую цитотоксичность, чем внутриклеточные. Результаты, обсуждение и заключение работы проиллюстрированы 17 рисунками. Представленные рисунки исчерпывающе иллюстрируют полученные данные и выводы исследования. Библиографический указатель включает 152 источников, из них 146 – зарубежных, главным образом это статьи последних 10 лет.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения, выносимые на защиту, получены с использованием современных методов клеточной и молекулярной биологии, иммунохимии. Представленные результаты опубликованы в 5 статьях рецензируемых высокорейтинговых журналах: FEBS Letters, Free Radical Biology and Medicine, Biochemical and Biophysical Research Communications, Journal Neurochemistry. Сформулированные на основании полученных результатов выводы обоснованы и подкреплены фактическими наблюдениями о цитотоксичности агрегатов формируемых ГАФД и хантингтином, а также усилении прионоподобных свойств polyQ в присутствии ГАФД. Разработанную автором клеточную модель можно считать эффективной платформой для скрининга низкомолекулярных веществ, препятствующих формированию цитотоксичных комплексов. Полученные автором данные могут быть использованы при преподавании курсов нейрхимии и цитологии в ВУЗах биологического и медицинского профиля: Московский Государственный Университет им. Ломоносова, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12; Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Университетская наб. 7-9; Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. И.М. Сеченова, Москва, ул. Трубецкая, д. 8; Первый Санкт-Петербургский Государственный Медицинский Университет им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8.

Научная новизна и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором диссертации впервые продемонстрирована способность ГАФД высвобождаться из мертвых и поврежденных клеток в комплексах с polyQ, на клеточной модели изучена цитотоксичность таких комплексов, наконец показано, что при проникновении комплексов, включающих ГАФД, усиливается агрегация нативного белка с polyQ нормальной длины. Достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации, подкреплена использованием современных методов, а также достаточным числом независимых экспериментов, обработкой данных с помощью адекватных методов статистического анализа.

Значимость полученных автором диссертации результатов для развития науки

Полученные Еленой Радиславовной результаты позволяют уточнить молекулярные механизмы межклеточной передачи белковых агрегатов при нейродегенеративных заболеваниях, предложить перспективную клеточную модель для исследования веществ, способных влиять на агрегацию белков, а также расширяют представления о полифункциональности ГАФД и ее патогенетической роли при болезни Хантингтона.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Полученные автором диссертации результаты и выводы целесообразно использовать в исследовательской работе научных коллективов, занимающихся изучением нейродегенеративных процессов и белок-белковых взаимодействий, таких как Лаборатория нейрохимии и обмена веществ, Кафедра биохимии, Биологический факультет, Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7-9, руководитель – д.б.н., профессор Ещенко Наталия Дмитриевна; Лаборатория межмолекулярных взаимодействий, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8, руководитель – д.б.н., профессор Иванов Алексей Сергеевич.

По существу диссертационной работы Михайловой Е.Р. не возникает вопросов. В тексте диссертации периодически встречается отсутствие пробелов между отдельными словами, однако, это не снижает общего положительного впечатления от работы и не умаляет заслуг автора.

Заключение

Диссертация Михайловой Елены Радиславовны «РОЛЬ ФЕРМЕНТА ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В МЕЖКЛЕТОЧНОМ ПЕРЕНОСЕ ПАТОГЕННЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА», представляемой на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология, является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, имеющей научно-практическую ценность в области клеточной биологии и нейробиологии, которое содержит решение научной задачи, имеющей важное значение для понимания механизмов развития нейродегенеративных заболеваний. По своей актуальности, научной новизне, объёму выполненных исследований и практической значимости полученных результатов представленная работа является законченной научно-квалификационной работой и отвечает требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор Михайлова Елена Радиславовна заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология».

Отзыв заслушан и утвержден на межлабораторном научном семинаре Отдела молекулярной генетики ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины", протокол № 7 от 27 февраля 2017 года.

Заведующий лабораторией биохимической генетики
Отдела молекулярной генетики
ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины",
д.б.н.



Соколов Алексей Викторович

Ученый секретарь Ученого совета
ФГБНУ "Институт экспериментальной медицины",
д.б.н.



Пшенкина Надежда Николаевна

17 марта 2017 года

197376, Санкт-Петербург, ул. Акад. Павлова, 12,

Тел: (812) 234 68 68

E-mail: iem@iemrams.ru

<http://www.iemspb.ru/>