

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.230.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО
УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ПО ДИССЕРТАЦИИ **МИХАЙЛОВОЙ ЕЛЕНЕ РАДИСЛАВОВНЫ**
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение диссертационного совета от 21 АПРЕЛЯ 2017 года, № 222/400

О присуждении **ЕЛЕНЕ РАДИСЛАВОВНЕ МИХАЙЛОВОЙ** (Россия)
учёной степени кандидата биологических наук

Диссертация «**РОЛЬ ФЕРМЕНТА ГЛИЦЕРАЛЬДЕГИД-3-
ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В МЕЖКЛЕТОЧНОМ ПЕРЕНОСЕ
ПАТОГЕННЫХ БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ В КЛЕТОЧНОЙ
МОДЕЛИ БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА**»

По специальности 03. 03. 04 – «Клеточная биология, цитология, гистология»

Принята к защите 23.12.16 г., протокол №216/395 Диссертационным советом Д 002.230.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук, адрес: 194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4, утверждён приказом Минобрнауки РФ №105/нк от 11.04.2012 г.

Соискатель **Елена Радиславовна Михайлова**, 1989 г.р., в 2012 году окончила биологический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Пермский государственный научный исследовательский университет» по специальности «биология» с присвоением степени «магистр биологии». С **6.11.2012** по **5.11.2015** проходила очную аспирантуру на базе Лаборатории защитных механизмов клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН). **Работает** в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт цитологии Российской академии наук в с 2012 г в Лаборатории защитных механизмов клетки, а с 2015 г по 2017 работала в Межлабораторной группе

конфокальной микроскопии и анализа изображений в клеточной биологии. С февраля 2017 г. по настоящее время Елена Радиславовна является младшим научным сотрудником в Лаборатории защитных механизмов клетки.

Диссертация выполнена в Лаборатории защитных механизмов клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук.

Научный руководитель:

Гужова Ирина Владимировна, доктор биологических наук (специальность 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология»), заведующий Лабораторией защитных механизмов клетки Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт цитологии Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

- 1. Савватеева-Попова Елена Владимировна**, доктор биологических наук (по специальности 03.02.07 – генетика), Заведующая Лабораторией нейрогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской академии наук, Санкт-Петербург;
- 2. Шмальгаузен Елена Викторовна**, кандидат биологических наук (по специальности 03.01.04 – биохимия), Доцент, ведущий научный сотрудник Отдела биохимии животной клетки Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, Москва.

дали положительные отзывы на диссертацию

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» (Санкт-Петербург) в своём положительном заключении (заключение составил заведующий лабораторией биохимической генетики Отдела молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», д.б.н. Алексей Викторович Соколов (специальность 03.01.04 – биохимия) **указала, что** диссертационная работа является оригинальным, законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием в области клеточной биологии, и

полностью соответствует всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней» № 842 от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к кандидатским диссертациям, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03. 03. 04.– «Клеточная биология, цитология, гистология», и **дала положительный отзыв на диссертацию.**

Соискатель имеет 9 опубликованных работ по теме диссертации, из них 5 статей (объемом 2 печ.листа) в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, и 4 тезисов докладов.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

1. Lazarev VF, Nikotina AD, Semenyuk PI, Evstafyeva DB, **Mikhaylova ER**, Muronetz VI, Shevtsov MA, Tolkacheva AV, Dobrodumov AV, Shavarda AL, Guzhova IV, Margulis BA. Small molecules preventing GAPDH aggregation are therapeutically applicable in cell and rat models of oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine. 2016, 92: 29–38.

В данной статье показано, что малые молекулы, способные связывать ГАФД, предотвращают её агрегацию, что снижают гибель клеток на 30%.

2. Lazarev VF, Nikotina AD, **Mikhaylova ER**, Nudler E, Polonik SG, Guzhova IV, Margulis BA. Hsp70 chaperone rescues C6 rat glioblastoma cells from oxidative stress by sequestration of aggregating GAPDH. Biochemical and Biophysical Research Communication. 2016, 470: 766–771.

В рамках данной работы было показано, что при окислительном стрессе значительная часть молекул ГАФД денатурирована, и ГАФД образует нерастворимые агрегаты.

3. **Mikhaylova ER**, Lazarev VF, Nikotina AD, Margulis BA, Guzhova IV. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase augments the intercellular transmission and toxicity of polyglutamine aggregates in a cell model of Huntington disease. Journal of Neurochemistry. 2016, 136: 1052–1063.

В данной работе был разработан метод на основе двухсайтового иммуноферментного анализа, позволяющий оценить количество ГАФД во внеклеточной среде, была продемонстрирована способность ГАФД усиливать проникновение комплексов polyQ внутрь живых клеток. Также были продемонстрированы механизмы, при помощи которых комплексы polyQ-ГАФД проникают внутрь живых клеток.

4. **Михайлова Е.Р.,** Лазарев В.Ф., Маргулис Б.А., Гужова И.В. Межклеточный перенос мутантного хантингтина и роль фермента глицер-альдегид-3-фосфатдегидрогеназы в этом процессе. Седьмой Российский симпозиум «Белки и пептиды». Новосибирск. С. 345

В данной работе была продемонстрирована способность ГАФД усиливать цитотоксические свойства polyQ. Показано, что внеклеточные агрегаты более токсичны своих внутриклеточных аналогов.

5. **Михайлова Е.Р.,** Лазарев В.Ф., Никотина А.Д., Маргулис Б.А., Гужова И.В. Горизонтальный перенос полиглутаминовых патологий и роль гликолитического фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в этом процессе. V съезд биохимиков России. Сочи, Дагомыс, 4-8 октября 2016. Acta Naturae, спецвыпуск, том 2, 2016. С. 64

В публикации представлены данные о токсичности кондиционированной клеточной среды, содержащей агрегаты. Показано, что ГАФД усиливает способность polyQ индуцировать агрегацию внутриклеточных нативных белков.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Заместителя директора по научной работе, заведующего Лабораторией генетического моделирования болезней человека Санкт-Петербургского филиала ФГБУН Института общей генетики имени Н.И.Вавилова РАН, д.б.н. **Алексея Петровича Галкина.** Отзыв положительный, имеются критические замечания и вопросы:

«...В плане критики я могу отметить лишь два момента, касающихся терминологии. В первом предложении автореферата автор пишет: «нейродегенеративные заболевания, как правило, связаны с накоплением внеклеточных или внутриклеточных агрегатов мутантных белков».

Это не совсем верное утверждение. В подавляющем большинстве случаев нейродегенеративные заболевания, которые вызваны накоплением болезнетворных агрегатов, не связаны с мутациями, а возникают спонтанно у людей преклонного возраста. Так, в случае прионных болезней, болезни Альцгеймера и Паркинсона у большинства пациентов не выявляется мутаций, влияющих на агрегацию белков. В случае неинфекционных амилоидозов причиной появления абберантных агрегатов являются возрастные изменения уровня продукции или секркции соответствующих белков. Болезнь Хантингтона является скорее исключением из этого правила – эта болезнь всегда ассоциирована с экспансией глутаминовых повторов в гене, который кодирует белок Хантингтин.

Ещё одно замечание касается предпоследнего предложения автореферата:

«Проникновение комплекса в клетку приводило к **прионизации** клеточного НТТ нормальной длины, а увеличение доли ГАФД в комплексе дозозависимым образом ускоряло процесс **прионизации**».

Клеточный «НТТ нормальной длины» на самом деле просто коагрегирует с мутантным полиглутаминовым трактом. Коагрегация и прионизация это совершенно разные вещи. Нормальная молекула белка Хантингтина сама по себе не формирует агрегаты и не обладает никакой инфекционностью, свойственной прионам. К сожалению, такие неточности достаточно часто встречаются и в научных статьях».

2. Заведующего Лабораторией Молекулярных Механизмов Биологической Адаптации Института Молекулярной Биологии РАН профессора, д.б.н., Михаила **Михаила Борисовича Евгеньева**. Отзыв положительный, без замечаний.
3. Заведующей лабораторией Сравнительной физиологии Института эволюционной физиологии и биохимии имени И. М. Сеченова РАН доцента, к.б.н. **Ирины Васильевны Екимовой**. Отзыв положительный, без замечаний.
4. Ведущего научного сотрудника Лаборатории структурной биохимии белка Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН» д.б.н. **Киры Андреевны Маркосян**. Отзыв положительный, без замечаний.
5. Доцента кафедры ботаники и генетики растений ФГБУ ВО «Пермский Государственный национальный исследовательский университет» к.б.н.

Сергея Анатольевича Шумихина. Отзыв положительный, без замечаний.

6. Заведующего кафедрой ботаники и генетики растений ФГБУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», профессора, д.б.н. **Светланы Витальевны Боронниковой.** Отзыв положительный, без замечаний.

7. Доцента кафедры ботаники и генетики растений ФГБУ ВО «Пермский государственный национальный исследовательский университет» д.б.н. **Ларисы Викторовны Новосёловой.** Отзыв положительный, без замечаний.

8. Заведующего Лабораторией клеточных взаимодействий ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, профессора, д.б.н. **Александра Михайловича Сапожникова.** Отзыв положительный, без замечаний.

9. Заведующего Лабораторией биологии клетки Института микробиологии и биотехнологии Латвийского университета, член-корреспондента Латвийской академии наук, профессора, д.б.н. **Александра Рапопорта.** Отзыв положительный, без замечаний.

В дискуссии принимали участие:

1. Д.б.н., проф. **Е.С. Корнилова**, член Совета
2. Д.б.н. **Е.В. Казначеева**, зав. лаб. ИККМ ИНЦ РАН
3. Д.б.н., **Б.А. Маргулис**, зав. ОКК ИНЦ РАН
4. Д.б.н., проф. **Е.Р. Гагинская**, член Совета
5. Д.м.н., проф. **М.М. Шавловский**, член Совета

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией выбранных специалистов в области клеточной биологии, в частности нейродегенеративных процессов, для более объективной оценки результатов, представленных в диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных

соискателем исследований:

Разработана новая научная концепция, рассматривающая способность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД) в комплексе с polyQ высвобождаться из мёртвых или повреждённых клеток и оказывать цитотоксический эффект в клеточной модели болезни Хантингтона;

предложена оригинальная научная гипотеза, объясняющая способность ГАФД усиливать проникновение polyQ внутрь живых клеток и агрегацию нативных белков с полиглутаминовым трактом нормальной длины;

доказано, что внеклеточные комплексы polyQ-ГАФД более токсичны, чем внутриклеточные агрегаты;

введены новые представления о патогенезе болезни Хантингтона.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказана достоверность данных, свидетельствующих о способности ГАФД усиливать проникновение polyQ внутрь живых клеток и агрегацию нативных белков с полиглутаминовым трактом нормальной длины. Доказана ведущая роль ГАФД в межклеточном переносе polyQ, а также её способность усиливать прион-подобные свойства polyQ;

применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс современных цитологических, микроскопических, биохимических методов, включающий культивирование клеток млекопитающих, иммуноблоттинг, трансфекцию клеток плазмидными конструкциями, конфокальную микроскопию, иммуноферментный анализ, а также методы анализа и обработки изображений и методы статистической обработки данных.

изложены аргументы на основе полученных экспериментальных фактов в пользу гипотезы о способности ГАФД усиливать проникновение polyQ внутрь живых клеток и агрегацию нативных белков с полиглутаминовым трактом нормальной длины;

раскрыто превалирующее влияние на жизнеспособность клеток внеклеточных агрегатов polyQ-ГАФД над внутриклеточными аналогами;

изучены внеклеточные и внутриклеточные комплексы polyQ-ГАФД, их цитотоксический эффект, способность ГАФД, polyQ и их комплексов высвобождаться из мёртвых или повреждённых клеток и проникать внутрь

живых клеток, способность ГАФД усилить способность polyQ проникать внутрь живых клеток и агрегацию нативных белков с полиглутаминовым трактом нормальной длины;

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что:

разработан и внедрен в практику научного исследования метод, позволяющий оценить уровень токсичности вне- и внутриклеточных агрегатов патогенных белков; метод количественного определения ГАФД в биологических жидкостях на основе двухсайтового иммуноферментного анализа; метод клеточного иммуноферментного анализа;

определены перспективы возможного практического применения результатов исследования для разработки системных методов диагностики и лечения болезни Хантингтона;

создана теоретическая база, существенно изменяющая представления о механизмах межклеточного переноса патогенных белков и их комплексов в клеточной модели болезни Хантингтона;

представлены новые данные, показывающие, что ГАФД в комплексе с polyQ способна высвобождаться из мёртвых или повреждённых клеток, и комплексы polyQ-ГАФД обладают цитотоксическим эффектом;

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты, представленные в диссертации, получены на сертифицированном оборудовании, выбор использованных методов обоснован спецификой работы и соответствует поставленным в работе задачам, достоверность экспериментальных результатов оценена с помощью адекватных методов статистической обработки данных;

теория построена на известных, проверяемых данных, согласуется с опубликованными экспериментальными данными по теме диссертации;

идея базируется на анализе данных современной литературы, на полученных ранее в лаборатории защитных механизмов клетки ФГБУН Института цитологии РАН данных, а также на обобщении и анализе собственного экспериментального материала;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по

рассматриваемой тематике;

установлено, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обосновано;

использованы современные экспериментальные подходы (конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, иммуноблоттинг, трансфекция клеток плазмидными конструкциями с флуоресцентными белками, иммуноферментный анализ) и адекватные методы статистической обработки результатов.

Личный вклад автора состоит в:

непосредственном участии соискателя в планировании и проведении экспериментов, получении, обработке, анализе и интерпретации данных, полученных с помощью современных методов клеточной и молекулярной биологии. Автор принимал непосредственное участие в апробации результатов исследований на всероссийских и международных научных конференциях и симпозиумах, в подготовке и написании статей и тезисов по теме диссертации.

Диссертация, посвященная роли фермента гликолиза ГАФД в межклеточном переносе патогенных белковых комплексов в клеточной модели болезни Хантингтона, является оригинальным, законченным (в рамках поставленных задач) научно-квалификационным исследованием в области клеточной биологии, которое содержит решение научной задачи, имеющей большое значение для понимания механизмов развития болезни Хантингтона на клеточной модели. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных Е.Р. Михайловой работах, в которых изложены основные научные результаты диссертации. Диссертационная работа полностью отвечает требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям (п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года) по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология».

На заседании 21 апреля 2017 г. диссертационный совет Д 002.230.01 принял решение присудить **Елене Радиславовне МИХАЙЛОВОЙ** учёную степень кандидата биологических наук по специальности «Клеточная биология, цитология, гистология» (03.03.04)

При проведении тайного голосования Диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 9 докторов по специальности рассматриваемой диссертации, участвующих в заседании, из 24 человек, входящих в состав Совета, проголосовали:

«ЗА» 14, «ПРОТИВ» 2, недействительных бюллетеней 1.

Заместитель Председателя

Диссертационного совета Д 002.230.01

на базе ИНЦ РАН,

доктор биологических наук, профессор

С.Н. Борхсениус



Учёный секретарь

Диссертационного совета Д 002.230.01

На базе ИНЦ РАН,

Кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

«24» апреля 2017