

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Елены Радиславовны Михайловой «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».

Актуальность темы диссертационной работы Е.Р. Михайловой не вызывает никаких сомнений, поскольку затрагивает важные аспекты, связанные с развитием болезни Хантингтона. В данной работе исследуются механизмы распространения заболевания, связанные с переносом патогенных белковых агрегатов из пораженных клеток в здоровые. Без понимания этих механизмов невозможно создание медикаментозных препаратов, способных сдерживать развитие болезни Хантингтона. Кроме того, данная работа имеет важное значение для понимания общих механизмов развития нейродегенеративных заболеваний. По указанным причинам представленная диссертационная работа является актуальным и важным исследованием.

Диссертация Е.Р. Михайловой изложена на 104 стр. Основные главы диссертации включают Введение, Обзор литературы, Материалы и методы исследований, Результаты, Обсуждение, Заключение и Выводы. Работа включает также список используемых сокращений, список цитируемой литературы и приложение. Список литературы содержит 152 ссылки (7 из которых на отечественные издания). Приложение содержит 3 таблицы, в которых приведены общие сведения о нейродегенеративных заболеваниях и белковых компонентах, вовлеченных в развитие этих заболеваний. Работа хорошо иллюстрирована 24 рисунками.

Обзор литературы написан хорошо и позволяет оценить вклад диссертанта в исследуемую проблему. В обзоре дается общая характеристика нейродегенеративных заболеваний, а также подробно рассматриваются особенности заболеваний, связанных с патологической агрегацией различных белков. Дается общая характеристика механизмов межклеточного переноса патогенных белков. Отдельная глава посвящена структуре и разнообразным функциям глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (ГАФД). В обзоре

представлены очень наглядные иллюстрации, которые демонстрируют молекулярные основы нейродегенеративных заболеваний, а также механизмы переноса патогенных белковых комплексов от пораженных клеток к здоровым.

По обзору литературы есть несколько замечаний. Хотелось бы отметить, что автор практически не рассматривает исследования других лабораторий, посвященные взаимодействию ГАФД с хантингтином и роли ГАФД в развитии болезни Хантингтона, хотя этот аспект имеет прямое отношение к теме диссертации. Создается впечатление, что у этого вопроса нет никакой истории, хотя на самом деле это не так. В разделе «Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа» ссылки на некоторые работы перепутаны. На стр. 36 ссылки на работы по негликолитическим функциям ГАФД и на работу по структуре ГАФД указаны неверно. Работы Skarzynsky et al. (1987) и Biesecker et al (1977) не имеют отношения к нитрозилированию ГАФД и к активации проапоптических белков, как это указано на стр. 38.

В главе «Материалы и методы исследований» достаточно подробно изложены основные экспериментальные процедуры, которые применялись в ходе выполнения данной работы. Нет никаких сомнений в том, что диссертант владеет разнообразными методами, позволяющими проводить исследования на клетках эукариот (культивирование клеток и оценка их жизнеспособности, конфокальная микроскопия, проточная цитометрия) а также стандартными биохимическими методами (электрофорез, иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ).

В качестве замечаний к данному разделу хотелось бы отметить следующее. Диссертант использует в работе рекомбинантные полипептиды с полиглутаминовыми последовательностями различной длины, что предполагает культивирование соответствующих бактерий, продуцирующих данные полипептиды. Однако автор не дает никакой информации по поводу условий культивирования продуцентов и индукции целевых белков. Методика выделения полипептидов также дана очень схематично; можно было бы дать описание условий культивирования продуцентов и метода выделения полипептидов в соответствующих разделах.

В главе «Результаты» в четырех экспериментальных разделах понятно и логично изложены полученные автором результаты, которые доказывают, что 1) ГАФД высвобождается из мёртвых и поврежденных клеток в комплексе с PolyQ, и эти комплексы токсичны для клеток; 2) ГАФД в комплексе с PolyQ способна проникать

внутри живых клеток и усиливать агрегацию нативных белков; 3) внеклеточные агрегаты комплексов PolyQ-ГАФД более токсичны, чем внутриклеточные.

В ходе исследования автор использует разнообразные подходы. Одной из используемых моделей являются клетки феохромоцитомы крысы PC-12-HttQ103, в которых индуцируется экспрессия патогенного белка, содержащего 103 полиглутаминовых повтора (HttQ103). Данная модель позволяет наблюдать образование агрегатов эндогенной ГАФД с HttQ103 в клетках при помощи конфокальной микроскопии, одновременно оценивая жизнеспособность клеток при помощи различных тестов. Автором было показано, что нерастворимые агрегаты, содержащие ГАФД и патогенный белок HttQ103, накапливаются в культуральной жидкости клеток PC-12-HttQ103 в результате их гибели. Токсичность этих агрегатов была очень наглядно доказана в экспериментах, в которых культуральную жидкость или изолированные агрегаты добавляли к интактным клеткам. При помощи этой же модели было показано, что внеклеточные агрегаты ГАФД-HttQ103 более токсичны для клеток, чем те же агрегаты внутри клеток. Еще один подход, описанный в данной работе, состоит в использовании рекомбинантных полипептидов (polyQ), содержащих различное число полиглутаминовых повторов (Q23 или Q58), для исследования их способности проникать в клетки нейробластомы человека и роли ГАФД в этом процессе. Добавляя данные полипептиды к клеткам по отдельности или совместно с ГАФД, было показано, что ГАФД значительно усиливает цитотоксический эффект полипептида Q58 благодаря тому, что в комплексе с ГАФД Q58 гораздо быстрее проникает в клетки и к тому же усиливает прионоподобные свойства полипептида Q58. Для исследования механизмов проникновения комплексов polyQ-ГАФД в клетки автором был применен метод ингибиторного анализа с применением специфических ингибиторов внутриклеточного транспорта. Было показано, что ГАФД осуществляет внутриклеточный транспорт polyQ с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза. Необходимо отметить, что для доказательства каждого из положений автор использует несколько независимых экспериментальных подходов, что безусловно повышает достоверность полученных результатов. Все эксперименты подробно описаны в тексте и иллюстрированы фотографиями (данные конфокальной микроскопии) и графиками с подробными подписями, благодаря чему материал легко воспринимается.

В целом экспериментальная часть работы производит хорошее впечатление. Есть небольшое замечание по поводу измерения количества агрегатов polyQ в клеточных лизатах (Рис. 23). В данном эксперименте содержание агрегатов polyQ в клеточных

лизатах возможно было слишком высоким для того, чтобы можно было оценить разницу между разными пробами. Другими словами, оптический сигнал от пятен на мембране находится на пределе верхней границы чувствительности прибора, и поэтому нельзя однозначно утверждать, что количество внутриклеточных агрегатов не зависит от времени инкубации клеток без замены среды. Возможно, разница была бы видна, если нанести меньший объем клеточных лизатов, так, чтобы попасть в интервал 50 – 400 единиц оптической плотности. Поскольку агрегаты выходят в культуральную среду из мертвых клеток, логично предположить, что чем больше мертвых клеток в образце, тем больше агрегатов должно выйти в культуральную среду и тем меньше должно остаться в клеточном лизате данного образца. И наоборот, в образце с живыми клетками содержание внутриклеточных агрегатов должно быть максимально высоким. Однако данное замечание никак не влияет на сделанный автором вывод относительно того, что именно внеклеточные агрегаты polyQ обладают цитотоксичным действием.

Еще одно замечание относится к стилю изложения. Мне кажется не очень удачным термин «биндер ГАФД», который в данной работе означает низкомолекулярное соединение, способное специфически связываться с белком. Возможно, для обозначения таких соединений было бы лучше использовать термин «лиганды».

Безусловно, сделанные замечания не умаляют ценности сделанной работы. Таким образом, можно с уверенностью сказать, что Е.Р. Михайловой была проведена большая, интересная и важная фундаментальная работа. Основные результаты работы изложены в диссертации и опубликованы в рецензируемых научных журналах из списка ВАК РФ и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования Web of Science и Scopus. Сделанные автором выводы соответствуют полученным результатам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Елены Радиславовны Михайловой «Роль фермента глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы в межклеточном переносе патогенных белковых комплексов в клеточной модели болезни Хантингтона» является законченным (в рамках поставленных задач) квалификационным научным исследованием, имеющим научно-практическую ценность в области клеточной биологии и важное значение для понимания механизмов развития нейродегенеративных заболеваний, а по содержанию полностью соответствует требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней»,

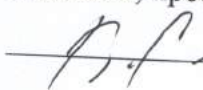
утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 N 842, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Елена Радиславовна Михайлова заслуживает присуждения искомой степени по специальности: 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология».

Елена Викторовна Шмальгаузен  
кандидат биологических наук,  
ведущий научный сотрудник отдела биохимии животной клетки  
Научно-исследовательского института физико-химической  
биологии имени А.Н. Белозерского  
Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова  
Контактный телефон: +7(495)939-14-56  
Рабочий адрес: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 40  
Официальный сайт МГУ: [www.msu.ru](http://www.msu.ru)  
E-mail: [shmal@belozersky.msu.ru](mailto:shmal@belozersky.msu.ru)

«24» \_марта\_ 2017 г.



Подпись Е.В. Шмальгаузен заверяю  
Директор научно-исследовательского института  
физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского  
Московского государственного университета  
имени М.В. Ломоносова  
академик, профессор



В.П. Скулачев

