

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Кудряевой Анны Анатольевны на тему:
«Молекулярный механизм узнавания полипептидных субстратов регуляторными
субчастицами протеасомы», представленной на соискание ученой степени
кандидата химических наук по специальности 03.01.04 - биохимия

Актуальность и научная новизна диссертации

Убиквитин-протеасомная система осуществляет убиквитинирование и деградацию множества белков, играющих ключевую роль в регуляции жизнедеятельности клетки. Неудивительно, что нарушения в системе убиквитин-протеасомной системе опосредуют патогенез ряда заболеваний человека, таких как злокачественные новообразования, нейродегенеративные заболевания. Помимо убиквитин-зависимой деградации протеасома осуществляет также убиквитин-независимый протеолиз некоторых белков, сигналом для которого является последовательность внутри самого белка или некоторая вспомогательная молекула. Сегодня известно около двух десятков белков, подвергающихся гидролизу протеасомой без предварительной модификации убиквитином. Одним из них предположительно является основной белок миелина (MBP), участвующий в поддержании компактности миелиновой оболочки аксонов многих нейронов и являющийся одним из основных возможных аутоантигенов при рассеянном склерозе. Доказательству убиквитин-независимого протеолиза MBP, определению механизма этого процесса, поиску специфической для такого протеолиза сигнальной последовательности в MBP посвящена работа Анны Анатольевны Кудряевой.

Научно-практическая значимость исследования

Диссертационная работа А.А. Кудряевой носит фундаментальный характер. Полученные в ней новые знания о механизмах работы такого сложного протеолитического комплекса как протеасома, а также разработанные подходы к направленному замедлению метаболизма MBP с помощью специфических ингибиторов иммунопротеасомы, также имеют практическое значение и могут быть в дальнейшем использованы для создания лекарственных препаратов, направленных на тканеспецифичное и избирательное подавление протеолитической активности протеасомы.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа А.А. Кудряевой построена по классической схеме, изложена на 130 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 239 источников. Диссертация иллюстрирована 45 рисунками.

Во введении автором обосновывается актуальность проводимого диссертационного исследования, четко формулируется цель и задачи, приводится общая характеристика работы.

Обзор литературы в диссертационной работе хорошо структурирован, содержит необходимые для понимания сложного функционирования убиквитин-протеасомной системы иллюстрации, достаточно полно отражает современное состояние науки в этой области. В этой главе рассмотрено несколько важных тем – структура и функции протеасомных комплексов, убиквитин-зависимый и независимый протеолиз белков протеасомой и в третьей части главы автор знакомит читателя с белком MBR в контексте роли его деградации протеасомой в развитии рассеянного склероза.

В связи с обзором хотелось бы обратить внимание, что несмотря на хороший иллюстративный материал, который призван облегчить понимание текста, нет ни единой ссылки в тексте на эти рисунки, что вызывает некоторую дезориентацию читателя в восприятии материала.

В разделе «Материалы и методы» представлен широкий спектр современных методов молекулярной и клеточной биологии, позволивших автору эффективно решить поставленные задачи. Следует особо отметить, что в диссертационном исследовании использовались также метод высокопроизводительного анализа биомолекул (транскриптомный анализ) и современный подход внутриклеточного ферментативного мечения белка PRIME (PRobe Incorporation Mediated by Enzymes), что подчеркивает оригинальность работы автора. Методы изложены достаточно подробно для их воспроизведения, видно, что автор квалифицированно этими методами владеет.

Глава «Результаты и их обсуждение» структурирована на разделы, в каждом из которых представлены результаты проведенных экспериментальных исследований и их детальный анализ. Глава содержит большое количество иллюстративного материала, помогающего читателю оценить значимость проведенного диссертационного исследования и не усомниться в достоверности полученных результатов.

А.А. Кудряевой после подбора условий внутриклеточного мечения белков резорубином для анализа их внутриклеточной деградации в физиологических условиях

определена стабильность убиквитина, полиубиквитиновых цепей разного типа ветвления, а также среднее количество мономерных единиц убиквитина на молекулу субстрата в состоянии динамического равновесия. Доказано, что убиквитин-независимый протеолиз MBP протеасомой обусловлен высоким положительным зарядом белка, опосредующим взаимодействие MBP с регуляторными комплексами протеасом. Важным с моей точки зрения является результат о том, что по итогам тщательного биоинформатического анализа аминокислотной последовательности MBP в работе теоретически предсказана и экспериментально доказана последовательность миелин-подобного дегрона, способного придавать полипептидам способность подвергаться гидролизу протеасомой без участия убиквитина. Показано ускорение протеолиза MBP при ассоциации протеасом с регулятором PA28. Нокдаун субъединиц PA28 и последующий биоинформатический анализ их аминокислотных последовательностей установил, что связывание MBP с альтернативным регулятором PA28 осуществляется благодаря гибкой полярной петле в структуре PA28 α .

Рассеянный склероз – аутоиммунное заболевание, при котором происходит разрушение миелиновой оболочки нервных волокон головного и спинного мозга. Основной ролью MBP обычно считается поддержание компактности миелиновой оболочки, поэтому направленное ингибирование гидролиза MBP возможно рассматривать в качестве подхода в терапии заболевания. А.А. Кудряева рассматривает две возможности замедления гидролиза MBP *in vivo*: ингибировать иммунопротеасомы или нивелировать положительный заряд MBP за счет посттрансляционных модификаций. Деиминирование MBP под действием PAD препятствовало взаимодействию MBP с протеасомой, что приводило к замедлению его гидролиза.

Выводы, выдвигаемые автором, четко сформулированы, резюмируют полученные данные и полностью соответствуют поставленным задачам.

Замечания и вопросы по диссертационной работе.

В качестве замечаний и вопросов к диссертационной работе А. А. Кудряевой можно выделить следующее:

1. Некоторые важные моменты в автореферате изложены не слишком ясно, эти моменты прояснились только после чтения диссертации, в то время как автореферат должен быть самодостаточным для понимания всей сути работы. Так, например, в автореферате очень тезисно описан эксперимент, в котором оценивается влияние деиминирования MBP пептидиларгининдеиминазой на его гидролиз протеасомой.

2. Несмотря на в целом аккуратное оформление работы, в ней, однако, встречаются опечатки, как например EMC29 на стр. 11. Используется различная номенклатура в написание субъединиц протеасом, как например, в случае с активатором PA28. В одном месте этот регулятор обозначен как 11S, в другом PA28. Его субъединицы упоминаются сначала как PA28αβγ, позже используется обозначение REGαβγ. Используются англицизмы «нефолдированные», «фьюзы», «энзиматическое». Не соответствуют друг другу описание схемы эксперимента добавления к клеткам ингибиторов протеасомы и деубиквитиnaz и резорурфина при определении времени полужизни молекулы убиквитина в тексте и пояснения в соответствующем рисунке (стр. 69 и Рис. 16).
3. Не совсем понятно, если деиминирование MBR под действием PAD препятствовало взаимодействию MBR с протеасомой и приводило к замедлению его гидролиза *in vitro*, почему тогда согласно данным в литературе у больных с хроническим рассеянным склерозом зафиксировано увеличение деиминирования MBR в зависимости от скорости развития заболевания.
4. Было бы неплохо, если бы диссертант в описании результата гидролиза MBR *in vitro* уточнил, как были получены различные очищенные комплексы 20S протеасомы с регуляторами PA28.
5. В силу того, что соавторы ранее показали, что иммунопротеасомы гидролизуют MBR эффективнее, чем конститутивные протеасомы, желательно дополнительно контролировать каспаза-подобную активность протеасом в реакции расщепления флуорогенных пептидов.

Все высказанные замечания не подвергают сомнению достоверность полученных результатов, не отражаются на их высокой научной значимости и не портят общего очень хорошего впечатления от диссертационной работы.

Заключение

На сновании вышеизложенного считаю, что исследование Кудряевой Анна Анатольевны по своей актуальности, новизне и значимости результатов, в которых содержится оригинальное решение актуальной научной задачи, удовлетворяет всем требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических

наук, а ее автор Кудряева Анна Анатольевна заслуживает присуждения искомой ученой степени по специальности 03.01.04 - биохимия.

Старший научный сотрудник Института цитологии РАН

к.б.н. А.С. Цимоха

12.02.2018

Подпись А.С. Цимоха заверяю

Ученый секретарь Института цитологии РАН

к.б.н. И.И. Тюреева



Контактная информация:

194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4

Телефон канцелярии +7 (812) 297-18-29

Эл. почта cellbio@incras.ru

Официальный сайт www.incras.ru