

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Серпионова Генриха Владимировича «Роль взаимодействий между амилоидогенными белками в возникновении и токсичности амилоидов гентингина человека у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Амилоидозы представляют гетерогенную группу заболеваний, общей чертой которых является появление амилоидов – белковых агрегатов с регулярной структурой, формирующейся посредством образования межмолекулярных бета-слоёв. Молекулярные механизмы, лежащие в основе появления и роста амилоидных агрегатов, являются предметом интенсивного изучения с целью определения возможных молекулярных мишеней для разработки эффективных лекарственных препаратов для терапии амилоидозов. Другим недавно появившимся аспектом интереса к механизмам формирования амилоидных агрегатов являются их уникальные свойства (регулярная структура, устойчивость к внешним воздействиям), которые могут быть использованы в нанотехнологии при конструировании многофункциональных бионаноматериалов.

Болезнь Гентингтона – генетически детерминированное нейродегенеративное заболевание – представляет типичный амилоидоз, связанный с образованием амилоидных агрегатов мутантной формой белка гентингина с удлиненным (сверх определённого критического значения) полиглутаминовым N-концевым доменом. Несмотря на значительное количество работ, выполненных с использованием различных экспериментальных моделей болезни Гентингтона (мышинная модель, дрозофила, черви *C. elegans*, дрожжевая модель), многие важные аспекты молекулярного патогенеза этого заболевания – такие как роль в патогенезе болезни нормального гентингина, кодируемого немутантным аллелем, вовлечённость других белков в процесс амилоидоза и их роль в токсичности амилоидов гентингина – остаются неясными или данные о них противоречивы. В связи с этим не вызывает сомнений актуальность диссертационной работы Серпионова Г.В., целью которой было изучение на дрожжевой модели способности нормального гентингина человека к формированию амилоидных агрегатов и выяснение механизма их токсичности, а также сравнение механизмов токсичности мутантного гентингина человека в разных штаммах дрожжей.

Диссертация Серпионова Г.В. изложена на 144 страницах и имеет традиционную структуру, включающую разделы “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты”, “Обсуждение”, “Заключение” (содержащие выводы) и “Список литературы”, состоящий из 215 ссылок на оригинальные источники. Результаты диссертации и сопутствующие пояснения иллюстрированы 37 рисунками и 4 таблицами.

Оформление диссертационной работы Серпионова В.Г. обеспечивает ясное понимание результатов выполненного им исследования и экспериментальных приемов, которыми они были достигнуты. Сожаление вызывает только значительное число ошибок пунктуации в тексте диссертации.

В разделе «Введение» автор рассматривает актуальность и степень разработанности темы исследования и логично подходит к формулировке цели и задач исследования. В этом разделе автор также формулирует научную новизну, теоретическую и практическую значимость исследования, и представляет положения, выносимые на защиту. В качестве замечания можно отметить недостаточное освещение во введении, по моему мнению, роли белков Sup35, Sup45 и Def1 в механизме токсичности амилоидов мутантного гентингина, что затрудняет понимание задач исследования, сформулированных автором. Это понимание приходит только после ознакомления со следующим разделом диссертации – обзором литературы, где данные об их роли рассмотрены достаточно подробно.

Раздел «Обзор литературы» оставляет сугубо благоприятное впечатление. В нем достаточно подробно представлено современное состояние проблематики, относящейся к теме диссертационного исследования Серпионова Г.В., включая известные данные о структуре и свойствах амилоидных агрегатов, механизмах амилоидозов и прионных болезней, и о роли различных белковых факторов и белок-белковых взаимодействий в молекулярном патогенезе этих заболеваний. Подробно рассмотрены полиглутаминовые заболевания с особым акцентом на болезнь Гентингтона; отдельно рассмотрено использование дрожжевой модели в исследовании молекулярных механизмов этого заболевания. В целом обзор литературы хорошо структурирован, информационно насыщен, не вызывает сколь-либо существенных замечаний и позволяет оценить вклад диссертанта в проблематику, связанную с изучением молекулярных механизмов, определяющих формирование амилоидов глутамин-богатых белков и их токсичность.

В разделе «Материалы и методы» представлены методы, которые диссертант применил для решения поставленных им задач. Несомненно, залогом успешности решения этих задач послужило использование диссертантом широкого набора плазмид, полученного в лаборатории, где выполнялось исследование, часть из которых была сконструирована диссертантом в ходе выполнения диссертационной работы. В качестве основного аналитического подхода была выбрана оценка токсичности амилоидных агрегатов по жизнеспособности дрожжевых клеток на основе 'спот теста' в комбинация с электрофоретическим анализом амилоидных агрегатов и мономеров амилоидных белков с использованием иммуноблоттинга, что позволило детектировать формирование амилоидов различных белков в тестируемой клеточной популяции. В качестве замечания можно

отметить недостаточно подробное, на мой взгляд, описание электрофоретического метода, использованного для оценки количества белка, находящегося в растворимой и агрегированной формах, который включает операцию кипячения гелей. Мне пришлось обратиться к оригинальным работам, ссылки на которые приведены диссертантом в данном разделе, чтобы прояснить для себя некоторые существенные технические детали этого метода. Также следует отметить, что по каким-то причинам диссертант не приводит описание метода флуоресцентной корреляционной спектроскопии в разделе «Материалы и методы», а даёт его описание в соответствующем подразделе раздела «Результаты» (где представлены результаты, полученные с использованием этого метода). В остальном описание методов и использованных методик достаточно полное. В целом выбор методов исследования адекватен поставленным диссертантом задачам, что, несомненно, было одним из факторов, предопределивших их успешное решение.

В разделе «Результаты» автором представлены полученные им экспериментальные данные, демонстрирующие, что немутантный гентингтин человека (Htt25Q) может образовывать токсичные для дрожжевых клеток амилоидные агрегаты в присутствии амилоидов искусственных полиглутаминовых белков (полиQ/QX) и прионогенного белка Rnq1. Показано, что токсичность связана с уменьшением количества жизненно важных факторов терминации транскрипции Sup35 и Sup45 в следствии инициированного амилоидами гентингина переходом мономерного Sup35 в амилоидные агрегаты, в которые также вовлекаются мономеры Sup45. Следует отметить, что диссертант сумел убедительно и очень элегантно раскрыть механизм токсичности амилоидов немутантного гентингина, использовав для этого штамм дрожжевых клеток, дефицитных по Sup35, и плазмиду, кодирующую жизненно важный C-концевой домен белка Sup35, который не способен агрегировать. Автором также показано, что передача амилоидной укладки между разными амилоидогенными белками происходит через последовательные стадии, включающие формирование амилоидных агрегатов каждым из этих белков и что такая передача 'асимметрична' – так, амилоидные агрегаты Htt25Q индуцировали агрегацию белка Sup35, но амилоиды Sup35 не вызывали амилоидной агрегации Htt25Q. Несомненный интерес представляют полученные автором результаты, указывающие на различие в механизмах токсичности мутантного гентингина (Htt103Q) в разных штаммах дрожжей: в то время как в одном штамме токсичность амилоидных агрегатов мутантного гентингина связана с инактивацией факторов транскрипции Sup35 и Sup45, в другом штамме роль Sup35 не столь исключительна и другой глутамин-богатый белок, Def1, вовлечён в механизм токсичности.

В целом диссертантом выполнена значительная экспериментальная работа, результаты которой выглядят убедительно. Тем не менее, у меня имеется ряд замечаний,

касающихся представленных экспериментальных данных, планирования экспериментов и обработки их результатов, которые перечислены ниже:

1. Не ясно, почему на рис. 11 не видно мономеров Sup35 на крайней справа электрофоретической дорожке (в отсутствии полимеров полиQ/QX и полимеров Htt25Q), хотя они видны в ряде случаев даже в присутствии агрегатов Sup35, индуцированных полимерами полиQ/QX и Htt25Q (две дорожки, прилегающие к ней слева). Автор никак не комментирует этот факт. Аналогичное замечание возникает и глядя на крайнюю справа панель рис. 15, где практически не видно мономеров Sup35 в отсутствии Htt25Q, тогда как полимеры, так и мономеры Sup35 видны при экспрессии Htt25Q в клетке.
2. На рис. 12 показано, что в случае фенотипа [*pin*⁻] коэкспрессия Htt25Q и искусственных полиглутаминовых белков, содержащих остатки тирозина (полиQ/QY), приводит к токсическому эффекту, а коэкспрессия с искусственными полиглутаминовыми белками, не содержащими таких остатков – не приводит. Здесь логично было бы дополнить эти данные результатами SDD-AGE-анализа, вместо того, чтобы апеллировать к литературным данным для их интерпретации. Особенно в свете того, что в статье, на которую ссылается диссертант, формально использовался несколько другой рекомбинантный белок, а именно полиQ/QY-Sup35MC (в диссертационном исследовании использовались белки полиQ/QX-Sup35M-NA или полиQ/QX-Sup35M-GFP, у которых отсутствует C-домен).
3. На стр. 70 автор указывает, что «отсутствие шаперона Hsp104 приводит к элиминации [*PIN*⁺]». Непонятно, как это соотносится с фенотипом [*pin*⁻]. Никаких комментариев на этот счёт автор не приводит. Следует отметить, что в случае делеции гена *HSP104* нет разницы между токсическим эффектом Htt25Q в присутствии полиQY и полиQT белков (рис. 13), в то время как в случае фенотипа [*pin*⁻] она была (рис. 12). В этом разделе исследования было бы весьма информативно провести SDD-AGE-анализ не только амилоидных агрегатов полиQY белка и Htt25Q (рис. 14), но и полиQT белка.
4. На стр. 73 автор обсуждает результаты денситометрического анализа SDD-AGE, представленного на рис. 14. Следует отметить, что сравнительная количественная оценка материала на геле требует четкого описания того, как это количество (пусть в каких-то условных единицах) определялось, а не просто упоминания того, что использовалась программа ImageJ. То есть необходимо указать, как выбиралась область на геле для оценки количества материала, каким образом учитывался вклад фона, и т.п. Не ясно также, линейна ли зависимость между количеством материала и интенсивностью сигнала при используемых автором протоколах SDD-AGE и иммуноблотинга. В любом случае, количественные оценки требуют определения не только средних значений, но и их статистических ошибок, а также статистической достоверности различий средних

значений, если таковые наблюдаются. К сожалению, диссертант эти требования проигнорировал. Такое же замечание можно сделать и в отношении обсуждения рис. 19 на стр. 82. Справедливости ради стоит заметить, что проведённые автором некорректным, на мой взгляд, образом количественные оценки не затрагивают «ядра» экспериментальных доказательств, на которых автор основывает как сделанные им выводы, так и положения, выносимые на защиту.

5. Как видно из рис. 25Б, электрофоретическая подвижность агрегатов Sup35 поменялась при разведении лизата клеток в три раза. Это может указывать на то, что не только размер, но и количество материала, наносимого на электрофоретическую дорожку, влияет на электрофоретическую подвижность амилоидных агрегатов, по крайней мере в данном конкретном случае. Этот факт может поставить под сомнение утверждение автора о том, что амилоидные агрегаты имеют одинаковый размер, основанное на совпадении их электрофоретической подвижности, сделанное на стр. 74 на основе данных рис. 15, поскольку на этом рисунке автор не приводит результатов SDD-AGE с различным количеством наносимого на гель материала.

В следующем разделе диссертации – «Обсуждение» – автор проводит анализ полученных им экспериментальных результатов, сопоставляя их с литературными данными. Среди прочего, этот анализ позволил ему сформулировать гипотезу о роли немутантных аллелей гентингина в патогенезе полиглутаминовых заболеваний. У меня нет каких-либо существенных замечаний по данному разделу диссертации Серпионова Г.В., за исключением того, что обнаруженное им различие в механизмах токсичности мутантного гентингина в разных штаммах дрожжей заслуживает более подробного обсуждения, в том числе и с точки зрения применимости дрожжевой модели для исследования молекулярного патогенеза болезни Гентингтона.

Все перечисленные выше замечания не являются критическими и не снижают высокого уровня диссертационной работы Серпионова Г.В. в целом. Результаты, полученные в ходе выполнения исследования – в первую очередь установление факта, что немутантный гентингин человека образует токсичные амилоидные агрегаты в присутствии амилоидов других полиглутаминовых белков, определение механизма токсичности амилоидов немутантного гентингина и его штаммовой специфичности – являются совершенно новыми. Их научно-практическая ценность состоит в углублении нашего понимания молекулярного патогенеза болезни Гентингтона и особенностей дрожжевой модели этого заболевания, которые следует учитывать при её использовании в тестировании различных соединений при поиске терапевтических подходов к лечению

болезни Гентингтона или облегчению её течения. Удачное комбинирование различных методов исследования и грамотное планирование экспериментов определяют достоверность полученных диссертантом результатов. В целом диссертационная работа Серпионова Г.В. выглядит как хорошо спланированное многоплановое исследование, наиболее важные итоги которого суммированы в разделе «Заключение» в виде выводов. Выводы диссертации обоснованы, соответствуют задачам исследования и полученным результатам. Автореферат соответствует основным положениям диссертации и в полном объеме отражает её основные идеи и содержание. По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 4 статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК и тезисы 4-х докладов в сборниках трудов международных и отечественных научных конференций. Следует особо отметить, что все статьи опубликованы в престижных зарубежных профильных журналах с высоким импакт-фактором.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Генриха Владимировича Серпионова на тему «Роль взаимодействий между амилоидогенными белками в возникновении и токсичности амилоидов гентингтина человека у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*» является законченным квалификационным научным исследованием и по содержанию полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 с изменениями №335 от 21.04.2016, предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Генрих Владимирович Серпионов, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.04 – «Биохимия».



Радко Сергей Павлович

кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник,
руководитель группы транскриптомного анализа
отдела протеомных исследований и масс-спектрометрии
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»
Адрес: 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр.8
Телефон: +7 499 2467115
E-mail: radko@ibmc.msk.ru

9 января 2019 г.

Подпись

Радко С.П.

заверяю

Ученый секретарь ИБМХ к.х.н. Карпова Е.А.

