



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

25 ЯНВ 2023

№ 85-01-19/74

На №

от

УТВЕРЖДАЮ

Директор Федерального
государственного учреждения

«Федеральный
исследовательский центр

«Фундаментальные основы
биотехнологии» РАН»

д.б.н. Федоров А.И.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» на диссертационную работу Епремяна Хорена Хачатуровича «Первые модели дрожжей *Yarrowia lipolytica*, экспрессирующие белок вируса гепатита В НВх и амилоид Аβ42: изменения в морфологии и функциях митохондрий» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, выполненную в лаборатории биоэнергетики ин. Биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук».

Актуальность работы

Митохондрии глубоко вовлечены в основные биохимические процессы клетки. Кроме своей основной энергетической функции они являются ключевым звеном множества сигнальных путей, процессов пролиферации, общего обмена, апоптоза, воспаления и многих других. Следовательно такой высокий уровень интеграции митохондрий в жизненные процессы клетки является основой для предположения об их вовлеченности и в патологические процессы. Действительно, в последние годы накопилось множество данных о ключевой роли митохондриального окислительного стресса в развитии онкологических, нейродегенеративных и ряда других социально-значимых заболеваний. И, хотя триггером патологии могут выступать структурные элементы онкогенных вирусов, амилоидные белки и другие соединения, эти заболевания, на определенных этапах патогенеза, развиваются по схожим путям: избыточная продукция активных форм кислорода (АФК) вследствие дисфункции митохондрий становится основным источником массивных повреждений редокс-чувствительных компонентов клетки (нуклеиновые кислоты, липиды, белки и др.), т.е. приводит к развитию генерализованного окислительного стресса, что становится основой для следующих этапов патогенеза.

Однако, как нейродегенерация, так и канцерогенез – сложнейшие комплексные патологии, а запутанность и многообразие процессов связанных с митохондриями создает серьезную преграду для верификации первичности митохондриальной патологии в развитии этих заболеваний. Следовательно, для изучения влияния митохондриального окислительного стресса требуются упрощенные модели, позволяющие определить морфологические и

биоэнергетические изменения в клетках под воздействием предполагаемых стимулов отдельно от факторов (хроническое воспаление, иммунный и цитокиновый ответ и т.д.), вызывающих окислительный стресс, как вторичный процесс. В связи с этим в качестве модельного организма использовали дрожжи аэробного типа обмена *Yarrowia lipolytica*. Эти дрожжи как нельзя лучше подходят для такого рода исследований. Они нетоксичны, являются облигатными аэробами, растут с высокой скоростью на простых средах разного состава, их геном полностью секвенирован, митохондрии этих дрожжей во многом сходны с митохондриями млекопитающих, что делает их удобным инструментом для гетерологической экспрессии и репрезентативной моделью для изучения морфологии и динамики митохондрий. В качестве объектов исследования были выбраны коровый белок вируса гепатита В – НВх, ассоциирующийся с развитием гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК, рак печени) и его усеченная по С-концу форма НВх120, а также амилоиды Аβ42 и Аβ40, имеющие огромное влияние на развитие болезни Альцгеймера (БА).

Таким образом изучение биоэнергетических показателей в упрощенных клеточных моделях, экспрессирующих вышеуказанные белки позволит проверить специфичность и определить конкретные молекулярные механизмы их воздействия на митохондрии. В совокупности с уже накопленными знаниями и будущими исследованиями в данной области, это прольет свет на роль митохондрий в развитии ГЦК и болезни Альцгеймера, что имеет решающее значение в поиске новых терапевтических подходов, учитывающих митохондриальный компонент патогенеза этих социально-значимых заболеваний, а также подкрепит фундаментальную основу для поиска аналогичных подходов в отношении других опухолевых и нейродегенеративных заболеваний.

Целью данной работы являлось изучить патологическое воздействие белка НВх и пептида Аβ42 на митохондрии и биоэнергетические параметры клеток в упрощенной дрожжевой модели; определить возможность предотвращения этих процессов с помощью митохондриально-направленных антиоксидантов.

Научная новизна

Впервые созданы мутанты дрожжей *Y. lipolytica*, способные экспрессировать белок НВх, НВх120 (усеченный по С-концу), пептиды Аβ42 и Аβ40. Кроме того, были созданы мутанты, экспрессирующие вышеуказанные белки, слитые с зеленым флуоресцентным белком eGFP с С- и N-концов. Найдены оптимальные условия выращивания дрожжей, а среди всех созданных мутантов отобраны те, что наиболее полно отражают действие экспрессируемых белков на биоэнергетические параметры клеток. Было проведено комплексное исследование энергетических параметров изолированных митохондрий исследуемых дрожжевых мутантов, определившее механизмы, лежащие в основе дисфункции митохондрий, индуцированной экспрессируемыми белками. Прослежены последствия индуцированной дисфункции митохондрий на целых клетках мутантов. На созданных дрожжевых мутантах было протестировано действие хорошо изученных в нашей лаборатории митохондриально-направленных антиоксидантов семейства SkQ. Показано, что антиоксиданты в низких концентрациях снижали уровень окислительного стресса и клеточной смерти в исследуемых клетках.

Практическая значимость

Полученные результаты свидетельствуют о прямом патологическом действии НВх и Аβ42 на митохондрии клеток, что должно учитываться в дальнейших исследованиях и поиске перспективных терапевтических средств социально-значимых заболеваний связанных с активностью этих пептидов. Митохондриально-направленные антиоксиданты семейства SkQ

могут являться эффективными агентами, снижающими проявления, характерные для экспрессии HВх и Аβ42, связанные с дисфункцией митохондрий и окислительным стрессом.

Конкретное личное участие автора в получении научных результатов

Экспериментальные данные, представленные в диссертационной работе, получены при непосредственном участии автором на всех этапах исследований, включая планирование, выполнение экспериментов, обработку полученных данных, а также оформление и публикацию результатов.

Степень достоверности результатов

Выводы, представленные в диссертации, полностью подтверждены экспериментальными данными. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Использованные методики исследования и проведённые расчёты корректны.

Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите

Представленная Епремяном Хореном Хачатуровичем диссертационная работа посвящена созданию дрожжевых моделей гетерологической экспрессии белка вируса гепатита В HВх и амилоида Аβ42 и изучению морфологических и функциональных изменений в митохондриях. Работа соответствует специальности 1.5.4 Биохимия, по которой рекомендуется к защите.

Апробация

Материалы работы были представлены на 4 международных и 2 всероссийских конференциях. По теме диссертации опубликовано 3 статьи, отражающие основной объём диссертационной работы, в изданиях, удовлетворяющих требованиям п. 13 «Положения о присуждении учёных степеней» утверждённого Правительством РФ от 24.09.2013 г. № 842, и перечню рецензируемых журналов ВАК РФ.

Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем учёной степени

Приведенные в работе результаты опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых Web of Science:

1. Epremyan K.K., Goleva T.N., Zvyagilskaya R.A. Effect of Tau Protein on Mitochondrial Functions // Biochemistry (Moscow), 2022, Vol. 87, No. 8, pp. 689-701. doi: 10.1134/S0006297922080028.
2. Epremyan K.K., Goleva T.N., Rogov A.G., Lavrushkina S.V., Zinovkin R.A., Zvyagilskaya R.A. The First *Yarrowia lipolytica* Yeast Models Expressing Hepatitis B Virus X Protein: Changes in Mitochondrial Morphology and Functions // Microorganisms. 2022 Sep 10;10(9):1817. doi: 10.3390/microorganisms10091817.
3. Epremyan K.K., Rogov A.G., Goleva T.N., Lavrushkina S.V., Zinovkin R.A., Zvyagilskaya R.A. Altered Mitochondrial Morphology and Bioenergetics in a New Yeast Model Expressing Аβ42 // Int. J. Mol. Sci. 2023 Jan 4; 24(2): 900. <https://doi.org/10.3390/ijms24020900>

Рекомендуемые оппоненты:

Сури́н Алекса́ндр Миха́йлович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Иванов Алекса́ндр Влади́мирович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук»


Рекомендуемая ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)».

Диссертация «Первые модели дрожжей *Yarrowia lipolytica*, экспрессирующие белок вируса

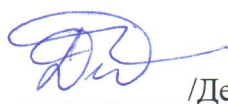
гепатита В НВх и амилоид Аβ42: изменения в морфологии и функциях митохондрий» Епремяна Хорена Хачатуровича на основании проведенного семинара рекомендуется к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.4 Биохимия.

Заключение принято на совместном семинаре лабораторий биоэнергетики, биохимии стрессов микроорганизмов, молекулярной генетики Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» путём открытого голосования. Присутствовало на семинаре – 11 человек. Результаты голосования: «за» – 11 чел., «против» – нет, «воздержалось» – нет. Протокол №1 от «19» октября 2022 г.

Председатель
совместного семинара зав. лаб., в.н.с.
лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов
д.б.н.

 /Шлеева М.О./

Секретарь
совместного семинара лабораторий
с.н.с. лаборатории биохимии
стрессов микроорганизмов к.б.н.

 /Демина Г.Р./

«25» января 2023 г.

