

О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу **Белогурова Алексея Анатольевича** «Биохимические основы аутоиммунной нейродегенерации», представленную на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия

Представленная к защите работа Белогурова А.А. посвящена исследованию молекулярных механизмов, лежащих в основе возникновения и развития аутоиммунной нейродегенерации. Аутоиммунные заболевания представляют одну из глобальных угроз здоровью человечества. В работе автор раскрывает целый ряд аспектов молекулярно-биологических и биохимических механизмов развития одного из наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний – рассеянного склероза. Полученные в работе результаты обладают значительным потенциалом практического применения. Автору работы удалось на основе фундаментального исследования создать инновационный препарат (Хемус), реализующий один из подходов к специфической терапии аутоиммунной нейродегенерации. Препарат в настоящее время проходит финальную стадию клинических испытаний. Поэтому выбранная тема диссертационной работы, безусловно, является актуальной.

Диссертационная работа Белогурова А.А. охватывает несколько основных направлений исследований: (i) изучение особенностей развития иммунного ответа при протекании рассеянного склероза и экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, (ii) определение взаимосвязи структуры миелин-реактивных антител и их функции (iii) открытие и исследование феномена убиквитин-независимого гидролиза основного белка миелина протеасомой, а также выявление физиологической значимости данного процесса при протекании аутоиммунной нейродегенерации (iv) разработка и апробация новых терапевтических стратегий для лечения рассеянного склероза, в том числе с использованием иммунотоксиков, инкапсулированных фрагментов основного белка, а также селективных ингибиторов иммунопротеасомы.

Работа изложена на 230 страницах, содержит 87 рисунков и 13 таблиц. Диссертация построена по классическому принципу и включает в себя разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Обзор литературы занимает примерно пятую часть общего объема диссертации и включает в себя общую характеристику патогенеза аутоиммунной нейродегенерации. Автор детально описывает известные к настоящему времени представления о приобретенном и врожденном иммунитете,

вносящие вклад в возникновение и развитие заболевания. В отдельной главе диссертант описывает композицию убиквитин-протеасомной системы, а также ее связь с возникновением антигенов и аутоиммунитетом. Представлены существующие животные модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелимита – модели рассеянного склероза. Значительная часть обзора посвящена систематизации способов терапии аутоиммунной нейродегенерации, как уже давно известных, так и только разрабатываемых. Каждый подход описан с точки зрения молекулярного механизма действия, что помогает далее корректно оценивать полученные в работе результаты. В целом обзор литературы, включающий 428 ссылок, подавляющее большинство которых относится к работам последних 10-15 лет, наглядно подчеркивает уровень сложности проблематики, с которой столкнулся диссертант. Раздел «Материалы и методы» детально описывает методы, использованные при выполнении диссертации. Следует отметить широкое использование в работе самых современных подходов, а также ряд разработанных автором уникальных методов, таких как количественный анализ пептидов, представленных в продуктах гидролиза основного белка миеллина протеасомой с использованием воды, содержащей изотоп кислорода с массовым числом 18.

«Результаты и обсуждение» изложены на 100 страницах и содержат 61 иллюстрацию. Эта часть диссертации состоит из двух разделов: «Изучение биохимических аспектов аутоиммунной нейродегенерации» и «Новые подходы к терапии рассеянного склероза». Упомянутые разделы взаимосвязаны, так как результаты фундаментальных исследований изучаемых процессов использованы при разработке новых подходов к терапии.

Первое направление описывает исследования фундаментального характера. Представляло значительный интерес исследовать спектр аутоантител, возникающих при рассеянном склерозе и аутоиммунной нейродегенерации. Автору удалось установить специфичность поликлональных миелин-реактивных антител с использованием библиотеки эпитопов основного белка миеллина – одного из главных аутоантигенов при аутоиммунной нейродегенерации. Далее был использован эффективный комбинаторный подход и создана фаг-дисплейная библиотека одноцепочечных антител на основе В-клеток пациентов с рассеянным склерозом. С ее помощью впервые была подтверждена гипотеза «молекулярной мимикрии» на молекулярном уровне, поскольку в процессе селекции удалось отобрать ряд моноклональных антител, способных одновременно связывать миелиновый и вирусный антиген. В этой части работы использованы физико-химические подходы, такие как метод поверхностного плазмонного резонанса. С его помощью была проведена количественная оценка сродства иммуноглобулинов к

основному белку миелина. Нельзя сказать, что найденные характеристики могут быть объяснены простыми физико-химическими закономерностями, но, тем не менее, автор попытался объяснить некоторые характеристики этих взаимодействий структурной вариабельностью антител.

Значительный интерес представляет часть работы, посвященная открытию и изучению молекулярного механизма убиквитин-независимого гидролиза основного белка миелина (МВР) протеасомами. Было достоверно установлено, что МВР подвергается гидролизу протеасомой в отсутствие каких-либо компонентов системы убиквитинилирования. Для установления механизма этого процесса были созданы различные варианты МВР, содержащие замены аминокислотных остатков, а также МВР, содержащий модифицированные остатки, что позволило установить, что движущей силой наблюдаемого убиквитин-независимого протеолиза является определенная композиция заряженных аминокислот, а не конкретная аминокислотная последовательность. Наиболее вероятно, что правильно составленная композиция положительно-заряженных аминокислотных остатков, изменяя в нужном направлении узнающие детерминанты МВР, определяет его эффективное взаимодействие с каталитической субъединицей протеасомы и последующий гидролиз. Интересно, что МВР относится к белкам, имеющим неупорядоченную структуру. В этом белке были идентифицированы участки, отвечающие за «протеасомный сигнал» деградации этого белка, и далее было проведено конструирование миелин-подобных «дегронов». Эти структуры содержат последовательности, состоящие из заряженных остатков, которые могут определять убиквитин-независимую деградацию белков. Полученные результаты могут иметь общее значение для построения химерных белков с целью их гидролиза независимо от убиквитинилирования. На следующем этапе было детально исследовано взаимодействие МВР с протеасомой и роль субъединиц протеасомы в механизмах внутриклеточного гидролиза МВР. В целом, эта глава диссертации представляет очень важное исследование в области химии белков и соответствует специальности «биоорганическая химия», к которой отнесена данная многоплановая диссертационная работа. На следующих этапах работы диссертанту удалось проследить непосредственную связь обнаруженного механизма убиквитин-независимой деградации с развитием аутоиммунной нейродегенерации.

Вторая часть главы «Результаты и обсуждение» описывает успешные попытки создания специфических подходов к терапии аутоиммунной нейродегенерации. Найденные иммунодоминантные фрагменты основного белка миелина используются автором для дизайна бимодульных иммунотоксинов, обладающих способностью

направленно элиминировать популяцию аутореактивных лимфоцитов, а также для создания липосомной композиции для индукции толерантности иммунной системы к миелиновым антигенам. Фундаментальное знание роли иммунопротеасомы в патогенезе аутоиммунной нейродегенерации позволило автору выдвинуть и далее экспериментально подтвердить перспективность концепции использования специфических ингибиторов каталитической протеасомной субъединицы $\beta 1i$ для направленной терапии этого заболевания. Важно отметить, что Белогуров А.А. в своей работе приводит результаты клинических испытаний препарата Xemus, созданного на основе миелиновых пептидов, заключенных в маннозилированные однослойные липосомы. Это свидетельствует о значительном терапевтическом потенциале данной разработки. Таким образом, фундаментальные исследования, проведенные А.А. Белогуровым в его диссертационной работе, реализованы в разработке перспективного препарата для лечения рассеянного склероза. Следует специально отметить, что диссертация и автореферат прекрасно оформлены и иллюстрированы.

Резюмируя, можно утверждать, что работа Белогурова А.А. выполнена на высоком экспериментальном и научном уровнях. Тем не менее, можно отметить ряд недостатков, которые присутствуют в работе:

- 1) В частности, автором проведен детальный анализ аффинности комбинаций VH и VL миелин-реактивных антител МВР и перекрестной реактивности против панели потенциальных аутоантигенов. Вероятно, что такая важная и большая работа проделана впервые. Тем не менее, не очень понятен вывод об «устойчивости» результирующей аффинности антител.
- 2) В работе открыт и детально исследован механизм убиквитин-независимый деградации МВР. Из обсуждения не до конца ясно, работает ли этот механизм только при одновременном истощении АТФ и ингибировании химотрипсиновой активности протеасомы или существуют физиологические условия, при которых могут работать оба механизма: убиквитин-зависимая и убиквитин-независимая деградация МВР.
- 3) Одним из важнейших этапов выполненной работы является выбор определенных пептидов МВР, вошедших в состав препарата Xemus. Хотелось бы увидеть в работе более концентрированное обоснование в главе 4.2.2 выбора именно этих фрагментов МВР.
- 4) Определенный интерес представляло бы рассмотрение перспектив совместного применения для лечения РС индукции иммунотолерантности пептидами МВР и ингибиторов протеасомы.

- 5) Несмотря на очень хорошее оформление диссертации, следует отметить, что список сокращений неполный, что затрудняет прочтение глав диссертации, зачастую переполненных сокращениями.
- 6) В тексте диссертации встречаются опечатки и неудачные выражения, хотя число этих недочетов весьма небольшое для такого объемного труда.

Высказанные замечания несколько не умаляют больших достоинств выполненной работы. Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертация полностью отражена в научных статьях, опубликованных автором в ведущих российских и зарубежных журналах высокого импакт-фактора, результаты работы неоднократно доложены на отечественных и международных конференциях.

Диссертация Белогурова А.А. «Биохимические основы аутоиммунной нейродегенерации» представляет законченное научное исследование, выполненное в очень актуальной области, и полностью отвечает требованиям "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора наук, а её автор Белогуров Алексей Анатольевич заслуживает присуждения искомой степени доктора химических наук по специальности 02.00.10 – биорганическая химия.

Официальный оппонент:

Заведующая лабораторией
биоорганической химии ферментов
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт химической биологии и
фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской
академии наук, чл.-корр. РАН, д.х.н.

Лаврик Ольга Ивановна

630090, Россия, г. Новосибирск,
пр. Ак. Лаврентьева, 8
Тел: +7 (383) 363-51-95
E-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Подпись Лаврик Ольги Ивановны заверяю

Ученый секретарь ФГБУН ИХБФМ СО РАН
к.х.н. Пестряков П.Е.

МП

