

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию на соискание ученой степени

кандидата биологических наук Кудрявцевой Софии Станиславовны

на тему: «Взаимодействие амилоидогенных белков с шаперонинами»

по специальности 1.1.10. – «Биомеханика и биоинженерия»

Диссертационная работа Кудрявцевой Софии Станиславовны посвящена выяснению роли АТФ-зависимых шаперонинов в патологической трансформации двух амилоидогенных белков, прионного белка овец и альфа-синуклеина, а также изучению структур комплексов шаперонинов с данными белками методом криоэлектронной микроскопии. Тема является чрезвычайно **актуальной** для современной биохимии и медицины, поскольку нейродегенеративные заболевания, связанные с мисфолдингом белков и образованием белковых агрегатов, являются одной из распространенных причин смертности. Взаимодействие шаперонов и амилоидогенных белков изучается уже несколько десятилетий, но данные о влиянии шаперонов на формирование и структуру амилоидных агрегатов и фибрилл противоречивы, поскольку выявление закономерностей взаимодействия шаперонов и амилоидогенных белков представляют собой сложную проблему.

В диссертационной работе была поставлена задача продемонстрировать взаимодействие шаперонинов эукариот и прокариот с амилоидогенными белками не только биохимическими методами, но и с помощью микроскопии, в том числе криоэлектронной микроскопии, а также молекулярного моделирования.

Работа изложена на 123 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты, Выводы, Благодарности и Список литературы, состоящий из 182 наименований. Работа содержит 2 таблицы и 34 рисунка.

Введение содержит подробное описание актуальности проблемы и степени разработанности темы, научной новизны, теоретической и практической значимости, методологии исследования, степени достоверности данных. В нем четко сформулированы цели и задачи работы, положения, выносимые на защиту, а также охарактеризован личный вклад автора и перечислены публикации по теме диссертации.

Обзор литературы представлен на 28 страницах и содержит актуальные сведения о классификации шаперонов и их роли в организме, влиянии шаперонов на патологическую трансформацию прионного белка и альфа-синуклеина, а также воздействию амилоидогенных белков на функционирование шаперонов. Автор выдвигает в общем справедливую гипотезу, что бактериальные шаперонины могут оказывать влияние на структуру амилоидогенных белков в кишечнике животных, в том числе человека, и вполне возможно, что изменивший свою конформацию белок способен проникнуть через стенки кишечника. Приведены и обсуждены интересные данные об участии бактериальных шаперонов кишечной микробиоты в патологическом изменении конформации амилоидогенных белков. Таким образом, в обзоре подчеркивается и доказывается неоднозначная роль шаперонинов в формировании амилоидных фибрилл. Кроме того, рассматриваются существующие данные о структуре и функциях всех объектов исследования, то есть прионного белка, альфа-синуклеина, бактериального комплекса шаперонинов GroEL-GroES и эукариотического шаперонина TRiC. Подробный обзор опубликованных работ свидетельствует о том, что автор хорошо ориентируется в современной научной литературе по данному вопросу и способен критически анализировать имеющиеся данные. Из обзора литературы хорошо видно, насколько важную роль для современной медицины могут играть научные исследования в этой области. Из недостатков главы «Обзор литературы» следует отметить небольшое количество иллюстраций, например укладка белковых цепей и схема формирования амилоидных фибрилл только описана в тексте, но не

дополнена рисунком, а первый рисунок встречается только на стр.24, когда уже обсуждено около 70 публикаций. Также нет рисунка, иллюстрирующего симметричный и асимметричный циклы работы шаперонина GroEL-GroES. Второе замечание касается отсутствия заключения из обзора литературы, которое бы резюмировало собранные данные и подчеркивало актуальность и новизну собственных исследований автора.

В разделе «Материалы и методы» методики написаны достаточно подробно, детально изложены процедуры выделения и очистки всех исследуемых в работе белков, описаны использованные физико-химические методы исследования, причем, например, в случае методики измерения флуоресценции тиофлавина приведено и объяснение сути метода. Кроме того, приведены протоколы подготовки образцов и параметры микроскопических экспериментов, а также молекулярной динамики, описаны этапы обработки экспериментальных данных, полученных на микроскопе, включая статистическую обработку. Таким образом, в диссертации автором был использован широкий спектр разнообразных методов, что показывает прекрасную методическую подготовку автора. Успешное сочетание самых разных методов исследования, как биохимических, так и микроскопии является одним из преимуществ данной работы. К этой главе у меня три замечания: 1) Отсутствует методика анализа содержания белка в собранных фракциях с помощью амидового чёрного. 2) Возникает вопрос, какой смысл несет соединение точек линиями на Рисунке 7 – если это аппроксимация, то нужно привести уравнение аппроксимирующей зависимости, а также коридор ошибок. 3) Не понятно, как «глубокая заморозка в жидком этане с использованием FEI Vitrobot Mark IV» возможна «при 4,5°C», если температура кипения этана составляет $-88,6^{\circ}\text{C}$, температура стеклования образца обычно -150°C , причем полученные образцы нельзя хранить при температуре выше -137°C .

Глава «Результаты и их обсуждение» разделена на пять подразделов, первый из которых посвящен получению гомогенных препаратов белков.

Второй раздел главы посвящен получению разных форм прионного белка, а именно олигомеров, протофибрилл и фибрилл, и их характеристике методом динамического светорассеяния и флуоресценции с подробным анализом полученных данных. В третьем разделе приведены результаты исследования взаимодействия комплекса GroEL-GroES с амилоидогенными белками, а в четвертом – данные по взаимодействию эукариотического шаперонина TRiC с разными формами прионного белка. В этой части работы использовался целый ряд физико-химических методов (динамическое светорассеяние, спектрофлуориметрия, иммуноферментный анализ), позволивших всесторонне охарактеризовать данные комплексы, что является одним из достоинств диссертации. Получены следующие интересные данные – при инкубации шаперонина с мономерами PrP образуются преимущественно удлиненные фибриллы, а в случае олигомеров – более короткие, однако взаимодействие эукариотического шаперонина с фибриллами PrP не приводит к разборке фибрилл. Особый интерес безусловно вызывает раздел пять, где приведены результаты микроскопии. На основании хорошо разрешенных структур GroEL-GroES (среднее расчётное разрешение комплексов составило 3,4Å) Софии Станиславовне удалось не только уточнить расположение атомов, но и предложить обновленную модель цикла работы шаперонинов, что, несомненно, является большим успехом данной работы и имеет принципиальное значение для понимания, как функционируют АТФ-зависимые шаперонины. Базируясь на уточненной модели, автором сделан важный вывод о том, что при высоком соотношении АДФ к АТФ в среде и в отсутствие неструктурированного субстрата имеет место только асимметричный цикл работы шаперонина GroEL-GroES, а полученные автором структурные данные характеризуют предельную стадию асимметричного цикла. Далее в подразделе 5.2 представлены интересные новые данные, полученные при изучении комплекса шаперонина GroEL с мономерной формой прионного белка. Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что прионный белок частично связывается в полости

шаперонина, взаимодействуя со спиральями «i» апикальных доменов пяти из семи субъединиц GroEL. Дальнейшее изучение полученной структуры методами молекулярной динамики подтверждает гипотезу, высказанную автором по результатам иммуноферментного анализа, что в полости GroEL связывается N-концевой домен прионного белка, а более амилоидогенный C-концевой домен остаётся свободным и может участвовать в амилоидной агрегации. Эти данные также являются новыми и важными для понимания роли шаперонинов в агрегации прионного белка. Затем методом крио-электронной микроскопии получена 3D структура комплекса GroEL-альфа-синуклеин и показано, что дополнительная электронная плотность альфа-синуклеина в полости GroEL похожа на электронную плотность, которая наблюдалась в комплексе GroEL-PrP. Однако в данном случае альфа-синуклеин полностью помещается внутрь шаперониновой полости и скрыт от контактов, что дополнительно подтверждается данными иммуноферментного анализа, приведенного в подразделе 3.2, где продемонстрировано отсутствие взаимодействия такого комплекса с антителами к альфа-синуклеину при соотношении белков 1:1. Одним из важных достижений автора является получение предварительных структурных данных о строении комплекса эукариотического шаперонина TRiC с прионным белком в присутствии с негидролизуемого аналога АТФ, АТФ- γ -S, со средним разрешением 6,2Å. Однако в тексте нет обсуждения полученной структуры, кроме указания разрешения, хотя можно было бы сравнить данную структуру с уже опубликованными.

По главе «Результаты и их обсуждение» у меня возникли следующие вопросы и замечания: 1) Следовало добавить в начало главы «Результаты и их обсуждение» хотя бы несколько вводных фраз. 2) Нет оценки чистоты полученных препаратов белков, которую можно было бы сделать по приведенной электрофореграмме. 3) логика автора относительно связи заряда молекул белка и скорости миграции ошибочна (стр. 68, обсуждение рис.11), поскольку при электрофорезе по Лэммли все белки переводятся в анионы и

двигаются к аноду, и увеличение отрицательного заряда белка будет скорее увеличивать подвижность, а не уменьшать ее. Увеличение кажущейся молекулярной массы альфа-синуклеина по-видимому связано с каким-то другим явлением. 4) на стр.68 указано, что из 1 г бактериальных клеток выделено 70-80 мг GroEL и GroES, хотелось бы уточнить, действительно ли клетки *E.coli* содержат такое большое количество шаперонинов. 5) На рис. 22 хотелось бы видеть контрольные данные о распределении частиц по размерам для прионного белка без эукариотического шаперонина. 6) В обсуждении рис.27 хотелось бы увидеть также более глубокий анализ полученных данных, например указание аминокислотных остатков, участвующих в образовании кармана связывания нуклеотида, а также обсуждение заметных различий в конформациях выделенных остатков и фосфатов нуклеотида для цис- и транс- колец шаперонина в узкой и широкой конформации, приведенных на этом рисунке. 7) на иллюстрациях, где приведены структуры шаперонинов, полученные методом криоэлектронной микроскопии, хотелось бы увидеть общие внешние размеры комплекса, чтобы сопоставить эти цифры с данными динамического светорассеяния.

К мелким погрешностям текста можно отнести опечатки или неудачные словосочетания типа: «здоровая изоформа мономера прионного белка», «образование одинарной дисульфидной связи», «обильно экспрессируется», «субъединица TRiC весит 60 кДа», «соединяли по отдельности», «линией из коротких точек» и т.п.

В целом, у меня сложилось хорошее впечатление о рассматриваемой диссертационной работе, представленный текст свидетельствует о способности Софии Станиславовны к критическому осмыслению своих результатов в контексте имеющихся в литературе данных. Работа представляет собой полноценное исследование, выполненное на высоком экспериментальном уровне с привлечением самых современных методов исследования, при помощи которых получены новые важные и оригинальные данные. Результаты данной работы имеют существенное теоретическое и

практическое значение для дальнейших исследований в данной области, достоверность полученных данных не вызывает сомнений и подтверждена статистическим анализом. Выводы, сделанные из диссертации, хорошо обоснованы и соответствуют приведенным результатам. Материалы диссертационной работы достаточно полно отражены в 7 публикациях, в двух из которых Кудрявцева С.С. является первым автором. Представленный автореферат по содержанию полностью соответствует диссертации.

Все высказанные замечания не принципиальны, и либо являются некоторыми претензиями к оформлению работы, либо носят дискуссионный характер и не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.1.10. – «Биомеханика и биоинженерия» (по биологическим наукам), а именно следующим ее направлениям: изучение механических основ и проявлений процессов роста, развития и адаптации биологических объектов и/или инженерия белков, разработка принципов модификации и создания белков с ценными свойствами, протеомика, фолдинг белков, а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Кудрявцева София Станиславовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.1.10. – «Биомеханика и биоинженерия».

Официальный оппонент:

доцент по кафедре химии природных соединений,

доцент кафедры химии природных соединений,
Химический факультет,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова»

Бачева Анна Владимировна

08.06.2023



Контактные данные:

тел.: +7 (495) 939-55-29; e-mail: anbach@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 02.00.10 - Биоорганическая химия

Адрес места работы:

119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова», Химический факультет, кафедра химии
природных соединений

тел.: +7 (495) 939-55-29; e-mail: anbach@belozersky.msu.ru

Подпись сотрудника доцента Бачевой А.В.. удостоверяю

дата

Личную под
ЗАВЕРЯЮ
Нач. отдел
химичес

