

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Лейси Евгении Викторовны
на тему: «Влияние фаговых шаперонинов на патологическую
трансформацию амилоидных белков»
по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия**

Диссертационная работа Е.В. Лейси посвящена изучению воздействия фаговых шаперонинов различной структуры на агрегацию и формирование фибрилл двух амилоидогенных белков: прионного белка овец и α -синуклеина, а также выяснению деталей механизма их взаимодействия. Актуальность темы обусловлена медицинской значимостью нейродегенеративных заболеваний, связанных с нарушением фолдинга белков и образованием патологических агрегатов, которые являются одной из частых причин смертности. Хотя влияние шаперонов/шаперонинов на амилоидные белки изучается давно, полученные данные остаются противоречивыми. Это связано со сложностью выявления закономерностей в их взаимодействии, а также с неоднозначным влиянием шаперонинов на формирование, структуру и токсичность амилоидных агрегатов и фибрилл.

В диссертационной работе была поставлена задача оценить влияние однокольцевого и двухкольцевого фаговых шаперонинов на формирование агрегатов и фибрилл α -синуклеина и прионного белка не только *in vitro*, но и при экспрессии в клетках человека, а также выявить, какие части структуры шаперонина вовлечены во взаимодействия с амилоидогенными белками.

Работа изложена на 148 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Заключение, Основные результаты и Выводы, Список сокращений и Список литературы, состоящий из 201 наименования. Работа содержит 2 таблицы и 38 рисунков.

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 систематизирует актуальные сведения о структуре и функции шаперонинов, в том числе об особенностях фаговых шаперонинов, а также включает в себя характеристику объектов исследования – двукольцевого и однокольцевого фаговых шаперонинов EL и ОВР. В обзоре приводятся данные о структуре, функции и патологической трансформации α -синуклеина. Отдельные главы посвящены этиологии болезни Паркинсона и влиянию шаперонинов на патологическую трансформацию α -синуклеина. Есть раздел, посвященный структуре, функции и патологической трансформации прионного белка, а также этиологии прионных заболеваний. В завершении приведено описание взаимодействия шаперонинов с прионным белком и их влияние на патологическую трансформацию прионного белка. Обзор фокусируется на ключевых аспектах работы, обеспечивая теоретическую базу для собственных результатов автора. Из недостатков главы «Обзор литературы» следует отметить нехватку иллюстраций (всего один рисунок) и отсутствие заключения из обзора литературы, которое бы резюмировало собранные данные и подчеркивало актуальность и новизну собственных исследований автора.

В разделе «Материалы и методы» методики написаны подробно, детально изложены как генно-инженерные методы, так и процедуры выделения и очистки всех исследуемых в работе белков, определения их функциональной активности, также описаны методы работы с клетками эукариот и использованные физико-химические методы исследования. В диссертации применялся широкий спектр разнообразных методов, что показывает прекрасную методическую подготовку автора. Успешное сочетание самых разных методов исследования, как биохимических, так и физических (светорассеяния и микроскопии) является одним из преимуществ данной работы.

Глава «Результаты и их обсуждение» разделена на семь подразделов, первый из которых посвящен получению гомогенных препаратов белков, второй – определению функциональной активности шаперонинов, в том числе делеционных мутантов. Далее приведены данные по связыванию фаговых шаперонинов с различными формами α -синуклеина (мономерами, олигомерами и фибриллами) и влиянию шаперонинов на агрегацию α -синуклеина. Была сделана попытка оценить влияние однокольцевого шаперонина OBP на агрегацию мутантной формы α -синуклеина A53T при их коэкспрессии в клетках млекопитающих. В шестом разделе обсуждаются результаты изучения влияния делеционных мутантов OBP на агрегацию мутантной формы α -синуклеина A53T и в завершение – данные по влиянию фаговых шаперонинов на агрегацию прионного белка. В этой части работы использовался целый ряд физико-химических методов (динамическое светорассеяние, спектрофлуориметрия, иммуноферментный анализ, микроскопия), позволивших всесторонне охарактеризовать взаимодействие фаговых шаперонинов с амилоидогенными белками, что является одним из достоинств диссертации. Получены следующие интересные данные: делеционный мутант однокольцевого шаперонина OBP без апикальных доменов (OBP Δ AD) способен формировать гептамерную кольцевую структуру, однако аномально быстро агрегирует при инкубации в буфере без АТР при 45°C, а 1,2 мМ АТР оказывает стабилизирующий эффект; фаговые шаперонины EL и OBP связывают различные формы α -синуклеина (при этом влияние АТР не оценивалось); бактериальный шаперонин GroE обладает антиагрегационной активностью в отношении α -синуклеина A53T независимо от наличия АТР; шаперонины EL и OBP препятствуют агрегации α -синуклеина (как дикого типа, так и мутанта) в отсутствие АТР, и, напротив, ускоряют фибриллизацию в присутствии 10 мМ АТР, причем OBP более эффективен, чем EL; подтверждена токсичность фибрилл α -синуклеина, образуемых под действием OBP в присутствии АТР, для клеток HEK293T и SH-SY5Y; также предположено, что шаперонин OBP способствует агрегации

α -синуклеина A53T при экспрессии в клетках HEK293T, хотя методом флуоресцентной микроскопии агрегаты не обнаруживаются и выживаемость клеток через три дня после трансфекции не меняется – по-видимому, необходима более длительная экспрессия для проявления эффекта. Особый интерес вызывают результаты, представленные в шестом разделе, где изучалось влияние делеционных мутантов ОВР на агрегацию мутантной формы α -синуклеина A53T. Показано, что в присутствии 10 мМ АТР апикальный домен ОВР связывает α -синуклеин A53T в растворе и снижает скорость его конверсии в амилоидные фибриллы (данные о фибриллизации в отсутствие АТР не приведены), а ОВР Δ AD, также как и полноразмерный ОВР, препятствуют спонтанной фибриллизации α -синуклеина A53T только в отсутствие АТР. Похожие данные получены и для прионного белка – фаговые шаперонины EL и ОВР (и в меньшей степени ОВР Δ AD) в отсутствие АТР не влияют на его агрегацию, а в присутствии АТР – стимулируют ее, причем довольно быстро образуются крупные агрегаты, особенно под действием двухкольцевого шаперонина EL. Интересно, что наиболее токсичной формой в отношении клеток нейробластомы SH-SY5Y оказались олигомеры прионного белка, а присутствие ОВР оказывало некоторый защитный эффект.

По главе «Результаты и их обсуждение» у меня возникли следующие вопросы и замечания: 1) На электрофореграмме выделенного прионного белка (рисунок 4) отчетливо видны полосы на уровне около 35 кДа, а в обсуждении указано, что примеси удалялись на последующих этапах лиофилизации и гель-фильтрации. Однако метод лиофилизации не позволяет удалять примесные белки, кроме того, электрофореграмма очищенного прионного белка не приведена. Таким образом, чистота использованного препарата прионного белка не понятна; 2) На электрофореграмме выделенных фаговых шаперонинов EL и ОВР (рисунок 6) не приведена дорожка с белками-маркерами молекулярной массы, а в дорожках, которые выделены рамкой, видно много белковых полос, в связи с чем утверждение

«Фракции, выделенные рамкой, содержат чистый белок» выглядит не совсем корректным; 3) Не приведено данных о действии апикального домена ОВР на агрегацию α -синуклеина A53T в отсутствие АТР, хотя для всех остальных шаперонинов такие эксперименты проводились. Кроме того, совсем не обсуждается, как вообще присутствие АТР может оказывать влияние в данном случае, ведь апикальный домен шаперонина не способен связывать АТР; 4) В тексте отсутствуют сведения о константах связывания шаперонинов и АТР, не приведены данные о средней внутриклеточной концентрации АТР, и не объясняется, почему концентрация АТР разная в разных экспериментах – при изучении агрегации шаперонина ОВР она составляла 1,2 мМ, а при изучении агрегации синуклеина и прионного белка – 10 мМ. Возможно, стоило посмотреть зависимость скорости агрегации от концентрации АТР; 5) В заключении хотелось бы увидеть более глубокий анализ полученных данных, например, какие части шаперонина способны влиять на агрегацию амилоидогенных белков, в какой конформации должен находиться шаперонин для того, чтобы мешать агрегации, и достаточно ли внутриклеточной концентрации АТР для того, чтобы оказывать влияние на агрегацию. Также не обсуждается, почему в случае α -синуклеина ОВР ускоряет агрегацию сильнее, чем EL, а случае прионного белка – наоборот, и нет указания на то, что клетка может противодействовать токсическому влиянию олигомеров α -синуклеина с помощью систем внутриклеточного протеолиза. К мелким погрешностям текста можно отнести непонятные подписи на некоторых рисунках (например, на рис. 8 ось ординат подписана как «Количество P_i , мкМ»; на рис. 13А указано «137 NaCl, 2,7 KCl»; на рис. 18 ось ординат подписана как «Оптическая плотность при $\lambda_{ex} = 320$ » - не понятно, почему указана длина волны возбуждения?; на рис. 22 ось ординат подписана как % PrP, хотя в подрисуночной подписи указано «Распределение α -синуклеина A53T (Syn) ...»; на рис. 38 А и В ось абсцисс подписана «Время, ч», хотя приведены спектры флуоресценции), также встречаются опечатки, несогласованные предложения («Полученные результаты

свидетельствуют позволяют предположить, что оба шаперонина...»)), и синтаксические ошибки.

В целом, у меня сложилось хорошее впечатление о рассматриваемой диссертационной работе, ее текст свидетельствует о способности Евгении Викторовны 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 шести публикациях, в трех из которых Лейси Е.В. является первым автором. Представленный автореферат по содержанию полностью соответствует диссертации.

Содержание диссертации соответствует специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия (по биологическим наукам), а именно следующим ее направлениям: инженерия белков, разработка принципов модификации и создания белков с ценными свойствами, протеомика, фолдинг белков (Биологические науки), а также применение генной инженерии для создания технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (культур клеток и тканей), осуществления манипуляций с генами, введения их в другие организмы и выращивания культур микроорганизмов, растений и животных (Биологические науки).

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени

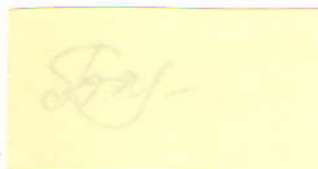
М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, 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 Лейси Евгения Викторовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.1.10. Биомеханика и биоинженерия.

Официальный оппонент:

кандидат химических наук, доцент
Доцент кафедры химии природных соединений Химического факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова»

Бачева Анна Владимировна



20.08.2025 г

Контактные данные:

тел.: +7(495)9395529, e-mail: anbach@belozersky.msu.ru
Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация: 02.00.10 – Биоорганическая химия (хим. науки)

Адрес места работы:

119234, Россия, г. Москва, тер. Ленинские горы, д. 1, стр.40,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Химический факультет, кафедра химии природных соединений
Тел.: +7(495)9395529; e-mail: anbach@belozersky.msu.ru

Подпись сотрудника Бачевой А.В. удостоверяю

7

Личную подп
ЗАВЕРЯЮ:
Нач. отдела
химическо

Пала...