

**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 "Влияние фаговых шаперонинов на патологическую трансформацию амилоидных белков" посвящена одной из важнейших тем современной биоинженерии - изучению амилоидной трансформации белков. Амилоидная трансформация белков является ведущим (или одним из ведущих) факторов развития нейродегенеративных заболеваний. Кроме того, отложения амилоида наблюдается и при ряде других заболеваний, патогенез которых, по большей части, не ясен. В своей работе автор сосредоточился на изучении возможной роли шаперонов в процессах формирования амилоидных агрегатов. Эта тема является важной, причем как с чисто научной, так и с прикладной точки зрения, т.е. актуальность представленного биоинженерного исследования несомненна.

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и их обсуждения, Заключение, Основные результаты и выводы, Благодарности и Список литературы. Работа изложена на 148 страницах, иллюстрирована 38 рисунками и 2 таблицами. Список цитируемой литературы включает 201 наименование. Положения, выносимые на защиту, обоснованы.

В ходе работы автор последовательно получил множество новых результатов. Хотелось бы отметить следующие, как имеющие большое научное и прикладное значение:

1. При инкубации *in vitro* альфа-синуклеина с фаговыми шаперонинами в присутствии АТФ образуются амилоидные фибриллы.

Напротив, в отсутствие АТФ оба шаперонина препятствуют образованию амилоидных фибрилл альфа-синуклеина.

2. Автор продемонстрировал, что коэкспрессия генов мутантной формы альфа-синуклеина А53Т и шаперонина ОВР в клетках НЕК293Т приводит к образованию небольшого количества агрегатов альфа-синуклеина. Интересно, что эти агрегаты не влияли на жизнеспособность клеток, хотя этот результат, все-таки, следует считать предварительным, он требует более глубокого анализа, что выходит за рамки целей и задач представленного исследования.

3. Показано, что при инкубации *in vitro* вирусных шаперонинов с прионным белком в присутствии АТФ образуются крупные агрегаты, которые по морфологии и свойствам отличаются от фибрилл прионного белка, формирующихся спонтанно.

Проведенная работа и полученные результаты являются новыми. Выводы работы полностью базируются на проведенных экспериментах, являются достоверными. По итогам работы опубликовано шесть статей, причем, в трех статьях Е.В. Лейси стоит первым автором. 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).

У меня нет никаких принципиальных замечаний или возражений по диссертации Е.В. Лейси, но необходимо отметить, что в ходе чтения было выявлено достаточно большое количество мелких недостатков, преимущественно в оформлении и представлении результатов работы.

Многие формулировки диссертации выглядят небрежными. Например, при описании препарата рекомбинантного шаперонина автор приводит следующее описание: “Анализ рекомбинантного ОВРΔAD с помощью электронной микроскопии показал, что он, как и полноразмерный шаперонин, состоит из 7 субъединиц, формирующих кольцевую структуру (рис. 10).” (стр. 73). Но на представленной фотографии субъединицы не видны.

Имеется некоторая небрежность в оформлении рисунков, что особенно касается оформление результатов электронной микроскопии. Например, на рисунке 10 масштабная линейка стоит почти посередине фотографии, что выглядит странно. Кроме того, на фотографии поставлена стрелка, но на что она указывает не написано. На других фотографиях масштабные линейки почти не видны (например, рис. 13 (стр. 77)), а их размер неадекватен описанию (описываются агрегаты диаметром 10-14 нм, а линейка имеет размер 2 мкм).

Так же в некоторых случаях трактовки микроскопических изображений кажутся неаккуратными. Например, один из экспериментов автор описывает следующим образом: “Как видно на рисунке 20, через 24 часа с начала инкубации, альфа-синуклеин A53T образует длинные фибриллы (Рис. 20 В). В то же время, при инкубации совместно с шаперонами в отсутствие АТР, через 24 часа мы наблюдали небольшое количество коротких фибрилл и аморфные агрегаты на электронных микрографиях как в случае EL (Рис. 20 С), так и в случае ОВР (Рис. 20 D).” Это описание соответствует приведенным фотографиям. Но далее дается такая трактовка: “Полученные данные свидетельствуют о том, что в данном случае шаперонины препятствуют агрегации α-синуклеина”. С этим сложно согласиться, так как в данном случае иллюстрируется скорее изменение характера формирующихся агрегатов (длинные фибриллы vs. аморфные агрегаты). Правильно было бы сказать - препятствует формированию длинных фибрилл.

Последнее замечание касается увеличения на фотографиях. Во многих случаях на одном монтаже автор приводит фотографии с разным увеличением. Это очень сильно мешает анализу приведенных изображений.

После прочтения диссертации у меня остались вопросы к нескольким экспериментам. Так, при изучении действия альфа-синуклеина (раздел 4.3.2) на культивируемые клетки автор использует МТТ-тест и пишет о “жизнеспособности клеток”. Правильнее было бы говорить о (цитотоксичности). Так же неправильно писать о “выживаемости клеток”, так как может происходить замедление роста. Кроме того, желательно было ввести в этот эксперимент негативный контроль.

Требуется объяснение и разница в размере агрегатов, полученная при использовании разных методов анализа. На стр. 10 агрегаты прионного белка описаны следующим образом: “что уже через 4,5 часа инкубации диаметр частиц становится свыше 500 нм” (метод ДРС). Но уже на стр. 112 сказано следующее: “За 4 часа инкубации при участии однокольцевого шаперонина ОВР в присутствии АТФ образуются короткие фибриллы прионного белка длиной менее 100 нм (рис. 34А)” (метод ТЭМ). Это различие требует объяснения.

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 1.1.1. Биомеханика и биоинженерия.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,

заведующий лабораторией ультраструктуры клеточного ядра

Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени

А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного

образовательного учреждения высшего образования «Московский

государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Шеваль Евгений Валерьевич

ПОД
УДО
ЗАВ КА
Н Н С

2025

Контактные данные:

тел.: +7 (495) 939-53-59, e-mail: fxb@gen

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация: 03.03.04 – Клеточная биология, цитология,

гистология

Адрес места работы:

119234, г. Москва, тер. Ленинские горы, д. 1, стр. 40

Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени

А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В.

Ломоносова

Тел.: +7 (495) 939-53-59; e-mail: fxb@belozersky.msu.su