

**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 важной и интересной проблеме – выяснению того, как фаговые шаперонины EL и OBP влияют на патологическую трансформацию амилоидных белков альфа-синуклеина и прионного белка. Такая трансформация, вызываемая неправильным сворачиванием (мисфолдингом) амилоидных белков, сопровождается образованием агрегатов таких белков и амилоидных фибрилл, что приводит к развитию целого ряда тяжелых нейродегенеративных заболеваний (таких, как болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и др.). Борьба с такими заболеваниями является одной из важнейших задач современной медицины. При этом большое внимание уделяется исследованиям взаимодействия шаперонинов с амилоидогенными белками, которое может препятствовать, хотя бы отчасти, агрегации таких белков. Однако слишком мало пока известно об особенностях взаимодействия фаговых шаперонинов (EL и OBP) с амилоидогенными белками (в частности, с альфа-синуклеином и прионным белком). Именно это и явилось главной целью работы, проведенной Е.В. Лейси, в результате которой были получены принципиально новые данные об особенностях такого взаимодействия. Не исключено, что дальнейшее развитие исследований в этом направлении позволит разработать новые белковые лекарственные препараты на основе фаговых шаперонинов и их фрагментов для лечения нейродегенеративных заболеваний. В связи с этим **актуальность, новизна и практическая значимость** рассматриваемой работы не вызывают никаких сомнений.

Диссертация построена по общепринятой схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка

цитированной литературы, включающего 201 ссылку. Работа изложена на 148 страницах и хорошо иллюстрирована 38 рисунками и 2 таблицами.

Обзор литературы безусловно заслуживает особого внимания и отдельного рассмотрения как самостоятельная глава диссертации. Он состоит из 3 глав, в которых сначала рассматриваются структурно-функциональные особенности фаговых шаперонинов – двухкольцевого шаперонина EL и однокольцевого шаперонина OBP, а затем подробно описываются структура и свойства исследуемых в работе амилоидогенных белков – альфа-синуклеина и прионного белка. Особое внимание уделено при этом рассмотрению имеющихся в литературе данных о влиянии этих шаперонинов на патологическую трансформацию альфа-синуклеина и прионного белка. В целом, обзор литературы производит очень хорошее впечатление. Он написан хорошим языком, четко и логично, содержит ссылки на публикации последних лет, читается с большим интересом и наглядно свидетельствует о том, что диссертант прекрасно ориентируется в имеющейся литературе по рассматриваемым вопросам. Помимо этого, обзор полностью выполняет и свою главную функцию – он хорошо готовит читателя к последующему восприятию экспериментального материала.

Экспериментальная часть работы начинается с описания **материалов и методов исследования**, включающего как методы классической биохимии (различные виды электрофореза и пр.), так и целый ряд методов физико-химической и молекулярной биологии, иммуноцитохимии и клеточной биологии, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), методы динамического рассеяния света (ДРС) и спектроскопии кругового дихроизма (КД), трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), криоэлектронная микроскопия (CryoEM) и др. Такое успешное сочетание самых разных методов исследования является, безусловно, важной особенностью данной работы. Последующее ознакомление с результатами проведенного исследования убедительно свидетельствует о том, что диссертант в совершенстве владеет всеми этими методами.

Глава «Результаты и их обсуждение» состоит из 7 разделов. В первом из них подробно описывается получение исследуемых белков – альфа-синуклеина, прионного белка и вирусных шаперонинов OBP и EL. Приведенные электрофореграммы наглядно свидетельствуют о том, что все эти белки получены в высокоочищенном виде, что следует признать немалой заслугой автора.

Второй раздел «Результатов» можно условно назвать "подготовительным". Здесь проведена проверка функциональной активности полученных фаговых шаперонинов EL и OBP по их способности гидролизовать АТР и защищать от термической агрегации субстрат – эндолизин. Полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что оба шаперонина обладают сходной АТРазной активностью и способностью защищать белок-субстрат эндолизин от тепловой агрегации.

В последующих 4 разделах «Результатов» описываются данные о способности фаговых шаперонинов EL и OBP связываться с альфа-синуклеином и оказывать влияние на его агрегацию. Сначала при измерениях флуоресценции тиофлавина Т и при использовании метода твердофазного иммуноферментного анализа было установлено, что оба шаперонина, EL и OBP, действительно способны эффективно связывать разные формы альфа-синуклеина (как мономеры, так и амилоидные фибриллы). Лишь после этого были проведены подробные исследования влияния этих шаперонинов на агрегацию альфа-синуклеина. Важно отметить, что на первом этапе этих исследований автором диссертации была проведена оптимизация методики фибриллизации альфа-синуклеина с образованием амилоидных фибрилл (т.е. подбор условий, концентрации белка, выбор для дальнейших исследований альфа-синуклеина с мутацией A53T с более быстрой кинетикой агрегации и т.д.) (раздел 4.1 «Результатов»), которая была успешно использована в дальнейших экспериментах. Было показано, в частности, что обо шаперонина (двухкольцевой EL и однокольцевой OBP) могут стимулировать фибриллизацию мономеров альфа-синуклеина в присутствии АТР и

подавлять ее в отсутствие АТР (раздел 4.3.1 «Результатов»). Помимо этого, был получен целый ряд важных и интересных новых результатов, свидетельствующих о серьезном влиянии фаговых шаперонинов на функциональные свойства амилоидогенных белков. Так, была продемонстрирована высокая цитотоксичность амилоидных фибрилл альфа-синуклеина A53T, образуемых под действием ОВР, особенно высокая в присутствии АТР (рис. 24 в разделе 4.3.2 «Результатов»). Помимо этого, было подробно исследовано влияние делеционных мутантов шаперонина ОВР (его изолированного апикального домена и мутантной формы, лишенной апикальных доменов) на амилоидную трансформацию альфа-синуклеина A53T; оказалось, что оба эти мутанта, подобно полноразмерному ОВР, способны связываться с альфа-синуклеином и препятствовать его спонтанной фибриллизации в отсутствие АТР.

И, наконец, в последнем разделе 7 «Результатов» описывается влияние фаговых шаперонинов EL и ОВР на агрегацию прионного белка. Здесь особо интересно отметить тот факт, что оба шаперонина стимулировали амилоидную трансформацию прионного белка, но лишь в присутствии АТР, не оказывая при этом никакого влияния на такую трансформацию этого белка в отсутствие АТР (раздел 7.1 «Результатов»). На основании этих данных можно сделать важное заключение о том, что вирусные шаперонины могут оказывать пагубное влияние на амилоидную трансформацию прионного белка, не предотвращая ее, а, напротив, стимулируя такую трансформацию в присутствии АТР.

Диссертация завершается небольшим заключением, в котором автор кратко подводит главные итоги проделанной работы и высказывает некоторые предположения о возможности дальнейших исследований.

В целом, у меня сложилось очень хорошее впечатление от рассматриваемой диссертационной работы, которая наглядно свидетельствует о способности ее автора как к творческому сопоставлению получаемых результатов с имеющимися в литературе данными и

представлениями по рассматриваемым вопросам, так и к критическому анализу собственных результатов. Материал диссертации изложен хорошим языком, четко и логично, а количество обнаруженных опечаток совсем невелико. У меня возникло лишь несколько замечаний и вопросов к описанию результатов работы и оформлению диссертации, не имеющих, в общем-то, принципиального характера и не затрагивающих суть проведенного автором исследования и сделанных на его основе выводов:

1). В диссертационной работе неоднократно приводятся данные о получении, очистке и функциональных свойствах бактериального шаперонина GroEL и его кошаперонина GroES 65 (раздел 2.3 "Методов", разделы 1.4, 2.1 и 4.2 "Результатов"). Стоило ли это делать? Ведь работа посвящена исследованиям не бактериальных шаперонинов, а фаговых шаперонинов EL и OBP! (Стоит отметить, что в автореферате диссертации о бактериальных шаперонинах никакой информации нет). У меня создалось впечатление, что исходно Е.В. Лейси начинала свои исследования с изучения бактериальных шаперонинов, но затем, вследствие ряда причин, значительно затрудняющих проведение планируемых экспериментов (в частности, из-за высокого содержания бета-листов в структуре GroEL, не позволяющего судить об амилоидной природе образуемых агрегатов), переключилась на изучение фаговых шаперонинов EL и OBP. Если это так, то стоило ли все-таки вводить все изложенные на 15 страницах многочисленные данные об исследованиях бактериальных шаперонинов в работу, посвященную фаговым шаперонам?

2). Стр. 68 и рис. 8В на стр. 69: "Спонтанная и GroE-зависимая реактивация ЛДГ. Через час после начала реакции доля восстановленной активности увеличилась до 3% в случае шаперонин-зависимой реактивации, в то время как в случае спонтанной реактивации она оставалась ниже 1% на протяжении всего эксперимента". Повышение активности ЛДГ всего на 2% - это что, серьезно? Стоило ли приводить?

3). Особый интерес (по крайней мере для меня) вызывают обнаруженные автором АТР-зависимые эффекты амилоидной трансформации альфа-синуклеина и прионного белка в присутствии шаперонинов EL и OBP (разделы 4.3.1 и 7.1 "Результатов"). Представленные данные убедительно свидетельствуют о том, что оба шаперонина, EL и OBP, вызывают образование амилоидных фибрилл альфа-синуклеина и прионного белка лишь в присутствии АТР (Таблица 2, рис. 20–23 и 31–34). Мне кажется, что автор уделяет слишком мало внимания обсуждению и объяснению этих важных и интересных эффектов. Можно ли объяснить их, например, конформационными перестройками, происходящими в молекулах фаговых шаперонинов при связывании и гидролизе АТР? Хотелось бы узнать мнение автора по этим вопросам.

Легко заметить, что все высказанные вопросы и замечания носят сугубо полемический характер, нисколько не влияя при этом на общую высокую оценку выполненной Е.В. Лейси диссертационной работы.

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).

Подводя итоги, следует сказать, что рецензируемая диссертационная работа представляет собой полноценное завершенное исследование, выполненное на высоком экспериментальном уровне, с привлечением целого ряда современных методов, при помощи которых получены новые важные и оригинальные данные. В целом, диссертационная работа Е.В. Лейси

производит самое благоприятное впечатление, ее безусловно можно охарактеризовать как работу весьма высокого класса. Полученные данные имеют большое теоретическое и практическое значение для дальнейших исследований в рассматриваемой области; достоверность этих данных сомнений не вызывает. Основные положения, выносимые на защиту, как и выводы, сделанные в диссертации, хорошо обоснованы, убедительны и вполне соответствуют полученным результатам. Материалы диссертации достаточно полно отражены в 6 статьях, опубликованных как в международных рецензируемых журналах с достаточно высокими импакт-факторами – таких, как "Biochemical and Biophysical Research Communications" (IF=3,1, Q1), "Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics" (IF=3,2, Q1) и "Archives of Biochemistry and Biophysics" (IF=3,8, Q1), так и обзорная статья в отечественном журнале "Успехи биологической химии" (в переводе – "Biochemistry Moscow"), а также доложены на многочисленных конференциях. Следует отметить, что в 3 статьях, опубликованных в 2022–2025 г.г. в международных рецензируемых журналах, Е.В. Лейси является первым автором, что подчеркивает её ведущую роль в этих работах. Представленный автореферат диссертации по содержанию соответствует диссертации.

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:

доктор биологических наук, профессор по специальности "Биохимия", заведующий лабораторией структурной биохимии белка Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

ЛЕВИЦКИЙ Дмитрий Иванович

11 августа 2025 г.

Контактные данные:

тел.: 7(495)9521384, e-mail: levitsky@inbi.ras.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена диссертация:

1.5.4. - Биохимия

Адрес места работы:

119071, Россия, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, лаборатория структурной биохимии белка

Тел.: 7(495)9521384; e-mail: levitsky@inbi.ras.ru

Подпись д.б.н., проф. Д.И. Левицкого удостоверяю:

Ученый секретарь ФИЦ биотехнологии РАН
кандидат биологических наук

Орловский

11 августа 2025 г.