

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Шенфельда Александра Анатольевича

на тему: «Идентификация белков, формирующих амилоидные агрегаты в мозге млекопитающих», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7.- Генетика

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертация Шенфельда Александра Анатольевича посвящена выявлению белков, демонстрирующих амилоидные свойства в мозге крысы *Rattus norvegicus*. Принимая во внимание, что образование амилоидов является причиной многих неизлечимых заболеваний человека, выяснение причин возникновения агрегатов белка и факторов, оказывающих влияние на амилоидогенез, является актуальной задачей. Обнаружение функционально значимых амилоидов во всех крупных доменах живой природы усиливает интерес к их изучению. Использование мозга *R. norvegicus* в качестве модели для исследования амилоидогенеза, позволит выявить закономерности этого процесса у млекопитающих. В связи с вышесказанным диссертационная работа Шенфельда Александра Анатольевича является весьма актуальной и своевременной.

Для достижения цели диссертации и решения поставленных задач, автор использует интегральный подход, сочетающий методы генетической инженерии, биохимии, в том числе, разные виды хроматографии и электрофореза, иммунохимии, микроскопия, протеомного анализа. Использование этих методов позволило получить информацию, отличающуюся новизной и представляющую практический интерес. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

Научная и практическая значимость работы

Полученные Шенфельдом А.А. результаты, бесспорно, обладают научной новизной. Автором были выявлены белки MBP, FXR1, NSF, STXB1 и RIMS1 мозга крысы как возможные функциональные амилоиды. Впервые показано, что основным белком миелина MBP функционирует в мозге крысы в амилоидной форме. Установлена аминокислотная последовательность, ответственная за агрегацию MBP. На основании полученных данных была предложена новая модель структурной организации компактного миелина, в состав которого входят амилоидные фибриллы белка MBP.

Изучение процесса амилоидогенеза белка MBP будет способствовать пониманию роли этого белка в формировании миелина, а также механизмов развития заболеваний, связанных с нарушением миелиновой оболочки нейронов, в частности рассеянного склероза.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Обоснованность научных положений и выводов подтверждается приведенными результатами, которые получены при использовании различных современных методов, адекватных поставленным задачам, и статистически обоснованы. Основные результаты работы были представлены на отечественных и международных научных конференциях и

опубликованы в отечественном и двух международных научных журналах, относящихся к первому и второму квартилю.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Шенфельда А.А. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводов, списка цитированной литературы и приложения. Работа изложена на 99 страницах, иллюстрирована 16 рисунками и 2 таблицами. В приложении содержится 5 рисунков. Список цитируемой литературы включает 241 источник.

Во введении автор подчеркивает актуальность проблемы, формулирует цель и задачи исследования, характеризует новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, приводит положения, выносимые на защиту и сведения о представлении полученных результатов.

Обзор литературы состоит из двух основных глав. Первая глава посвящена структуре и механизмам образования амилоидов, механизмам их идентификации, а также рассмотрению разных представителей функциональных амилоидов. Во второй главе подробно представлены сведения о структуре миелина, его роли в формировании миелиновых оболочек нейронов и свойствах основного белка миелина МВР. В этой главы отмечается недостаточная изученность роли отдельных изоформ белка МВР и его посттрансляционных модификаций в формировании миелина. Обзор литературы достаточно полно отражает состояние исследований в рамках темы диссертационной работы, написан хорошим языком и хорошо иллюстрирован. Возможно, не хватает какого-то заключения, в котором было бы приведено обоснование настоящей работы.

В главе «**Материалы и методы**» представлены использованные в работе методы генетической инженерии, гистологии, биохимии, протеомного и иммунохимического анализа, конфокальной и флуоресцентной микроскопии, приведены сведения о средах и условиях культивирования штаммов дрожжей и бактерий, Все использованные методы адекватны поставленным задачам и свидетельствуют о хорошей методической подготовке автора.

В главе «**Результаты**», которая состоит из 6 разделов, представлены экспериментальные данные, позволившие автору решить поставленные задачи, получить новые интересные результаты, касающиеся амилоидных свойств основного белка миелина МВР. В первом разделе приведены результаты выявления кандидатов на роль функциональных амилоидов среди устойчивых к детергентам агрегатов белка мозга крыс. В результате дополнительных исследований было отобрано пять белков: NSF, МВР, RIMS1, STXB1 и FXR1, которые выполняют разные функции. На основании собственных данных и данных других исследователей для дальнейшей работы был выбран белок МВР.

Далее было доказано, что все основные изоформы белка МВР присутствуют в мозге в виде нерастворимых олигомеров и агрегатов, устойчивых к обработке детергентами.

В следующем разделе приведены результаты биоинформатического поиска амилоидогенной последовательности в белке МВР, которая оказалась состоящей из 9 аминокислот PVVHFFKNI. Исходя из того, что изоформы МВР с молекулярной массой от

17 до 21 кДа формировали нерастворимые агрегаты автор делает вывод о том, что последовательность, ответственная за агрегацию MBP представлена во всех изоформах белка, кодируемых экзонами I, III, IV и VII. Для выявления фрагмента белка MBP, который отвечает за его агрегацию, была получена кДНК изоформы MBP 17.2 кДа, которая содержит все эти экзоны. При помощи ПЦР амплифицировали разные участки гена *MBP*, которые далее сшивали с последовательностью, кодирующей желтый флуоресцентный белок YFP. Полученные химерные гены клонировали под контролем регулируемого дрожжевого промотора *CUP1*, созданными рекомбинантными плазмидами трансформировали дрожжи. Затем при помощи флуоресцентной микроскопии оценивали состояние разных фрагментов белка MBP и доказали, что за его агрегацию отвечает последовательность от 60 до 119 аминокислоты.

В четвертом разделе автор осуществляет гетерологичный синтез фрагмента белка MBP (60–119 ак) в клетках бактерий *E. coli* и показывает, что рекомбинантный белок образует амилоидные фибриллы *in vitro*.

Далее при помощи конфокальной микроскопии автор показывает результаты связывания антител к белку MBP и амилоидоспецифичных красителей ThS и CR в миелинизированных нервных пучках.

В заключительном разделе этой главы доказано, что белок MBP, выделенный и очищенный из мозга крыс при помощи иммунопреципитации, связывается с амилоидоспецифичными красителями. Полученные результаты позволяют сделать закономерный вывод о том, что белок MBP в миелине представлен в амилоидной форме.

В главе «**Обсуждение**» автор анализирует полученные результаты, сопоставляет их с данными других исследователей и формулирует основной вывод о том, что белок MBP в миелиновой оболочке представлен в амилоидной форме и амилоидогенными свойствами обладает фрагмент белка от 60 до 119 аминокислоты. На основании полученных результатов автор предлагает новую модель организации компактного миелина.

Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам, вытекают из проведенных экспериментов, четко сформулированы, аргументированы и достоверны.

При ознакомлении с диссертацией возник ряд вопросов и замечаний:

1. Почему использовали разные системы экспрессии для изучения агрегации белка MBP (дрожжи) и получения рекомбинантного белка (бактерии)?
2. Во взаимодействии миелина с отрицательно заряженными компонентами мембран играют роль положительно заряженные аминокислоты аргинин и лизин. Ацетилирование и, в меньшей степени, фосфорилирование миелина должно влиять на это взаимодействие. Известно ли что-нибудь об этом?
3. Не смотрели ли влияние концентрации АТФ на агрегацию белка MBP *in vitro*?
4. Для характеристики размера белка правильно использовать не вес, а молекулярную массу. белка

Высказанные замечания и вопросы не затрагивают основных результатов и выводов диссертации и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Диссертационная работа Шенфельда Александра Анатольевича является научно-квалификационной работой, которая вносит существенный вклад в понимание

механизмов амилоидогенеза, расширяет представления о функциональных амилоидах. Полученные данные представляют интерес для специалистов в области молекулярной генетики, биохимии, молекулярной медицины.

Диссертация Шенфельда Александра Анатольевича на тему: «Идентификация белков, формирующих амилоидные агрегаты в мозге млекопитающих», соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Шенфельд Александр Анатольевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7.- Генетика. Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не обнаружены.

Член диссертационного совета

Д.б.н., доцент, профессор кафедры генетики и биотехнологии



(Падкина М.В.)

Дата 16.08.2022