

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 специальности 1.5.7. Генетика

В диссертационной работе Шенфельда Александра Анатольевича современным методом, разработанным ранее в лаборатории, в мозге молодых крыс выявлено около 50 белков, которые потенциально способны образовывать агрегаты, и предположительно имеющие роль в функционировании мозга. В сравнительно недавней публикации с участием автора наиболее вероятными белками с амилоидными свойствами признаны пять из них, один из которых, myelin basic protein, МВР, изучен в данной диссертационной работе подробно.

Амилоиды ассоциированы обществом с патологиями и заболеваниями, однако в последнее время появляется все больше данных о функционально значимых амилоидах. Это – новое в наших представлениях о механизмах регуляции жизненных процессов. Исследования в этой области, таким образом, являются чрезвычайно актуальными.

Диссертационная работа компактно изложена на 99 страницах, из них больше половины занимает отличный обзор литературы и список цитируемых работ – 57%, Материалы и методы, приложения, иные списки и титульный лист занимают еще 24%. На собственно результаты и их обсуждение приходится менее одной пятой работы (19%). Излишняя краткость несколько затрудняет восприятие экспериментальной части, делает ее узкоспециальной, но в то же время упрощает задачу рецензента. Положительным является то, что часть диссертации опубликована в статьях, где Александр Анатольевич является соавтором. Кроме того, в печати находится статья, где автор диссертации является первым автором.

Первым этапом работы являлось выяснение, какие белки в мозге крыс устойчивы к детергентам, то есть потенциально формируют амилоиды. Анализ проведен на высоком методическом уровне при использовании масс спектрометрии. Далее показано, что важный для мозга белок МВР образует устойчивые к детергентам агрегаты и показано, что этим свойством обладают все его изоформы. Анализ последовательности белка с помощью специальной программы позволил наметить, какие районы могут быть ответственны за образования агрегатов, и проведен частичный анализ роли этих районов в амилоидогенезе в гетерологичной дрожжевой системе. Далее показано, что очищенная с помощью бактериальной системы экспрессии химера фрагмента МВР (60-119) и SUMO способна давать амилоиды при трехдневной инкубации при комнатной температуре. Это подтверждено тремя методами: биохимически, с помощью электронной микроскопии и при наблюдении свойств белка при окрашивании специальным красителем в проходящем и поляризованном свете. Для лучшего понимания, что дают разные подходы, интересно было бы узнать, такой же ли результат будет получен с фрагментом 99-154, который не образовывал агрегаты в дрожжах.

Следующим этапом работы явилось иммуногистохимическое исследование МВР на срезах мозга крысы, в котором показана умеренная колокализация этого белка с районами, окрашиваемыми амилоид-специфическими красителями. Завершающим этапом работы явилось доказательство амилоидных свойств МВР, выделенного иммунопреципитацией из мозга крысы.

Обсуждение результатов состоит из двух частей. В первой последовательно суммированы результаты, а во второй предложена интересная и обоснованная модель, где «... молекулы МВР обеспечивают не только поперечную прошивку мембран, но и формируют сеть амилоидных фибрилл внутри уплощённых отростков олигодендроцитов», Рис. 16. Эта модель может объяснять механизмы процессов демиелинизации происходящие при старении и в патологии.

В целом логичные выводы автора все же, по нашему мнению, не совсем точно отражают проделанную работу. Вывод 2 является слишком категоричным, поскольку в работе не проводили прямой функциональный анализ амилоидной формы МВР в динамике развития. Вывод 3 не полностью убедителен, потому что анализ *in vivo* проведен в гетерологичной системе, не все варианты исследованы *in vitro* и есть некоторые расхождения с данными литературы.

Ни в коей мере не умаляя достоинства проделанной работы, мы считаем необходимым отметить те элементы диссертации, которые в дальнейшем, при превращении в научные статьи, требуют доработки. В основном эти замечания относятся к изложению работы, а не к результатам исследования.

Замечания и вопросы по тексту диссертации.

Автор не детализирует, какой тип анализа проведен с результатами первичного скрининга: Стр.51. «В результате *проведенного анализа* было отобрано пять основных белков-кандидатов...(Табл. 2)». Сама Таблица – это видоизмененная Табл. 1 из статьи с участием автора в Sci. Reports. Не очень понятно, почему и по какому принципу порядок строк с белками изменен и почему немного изменены описания функций. Остается также не до конца объясненным, почему МВР привлек «особое внимание». Поведение МВР подобно амилоидам довольно подробно изучено 9 лет назад в цитируемой работе Аггарвала с соавторами, (PLoS Biol., 2013).

Рис. 8 не объяснен (авторы просто пишут – «видно»). Хорошо было бы описать, что позволяют увидеть полуденатурирующие условия электрофореза, что такое «ранее полученный материал гомогената», стр. 40, какова концентрация белка в нанесенном экстракте, каковы массы белков видимых на иммуноблоте. Подпись сообщает только результат, но не то, как эксперимент был проведен и на что читатель должен обратить внимание на картинке. Помогла бы и ссылка на страницу секции Материалы, где все эта процедура подробно описана. По нашему мнению, если авторы хотят быть понятыми широкому кругу читателей, в тексте диссертации должна содержаться вся информация, необходимая для понимания результатов. Секция Материалы и Методы нужны в основном для специалистов, которые хотят повторить эксперименты.

На стр. 52 автор пишет, что в мономерной форме белок MBP *не детектируется*, но на Рис. 9Б все-таки присутствует столбик с примерно 2% относительной интенсивности полосы. Как это получилось?

Как автор прокомментирует разночтения в двух источниках:

Статья с участием автора в Sci Rep. , page 2: All of these proteins, **except MBP**, contain potentially amyloidogenic regions predicted by the ArchCandy algorithm (Table 1).

Диссертация, стр 53: При использовании биоинформатического подхода AMYLPRED2 (Tsolis et al., 2013), который основывается на объединении результатов предсказаний сразу нескольких независимых программ, в последовательности MBP был выявлен амилоидогенный мотив **PVVHFFKNI**, 109-117 ак (Рис. 10). Отметим, что вариант данного мотива, **QDENPVVHFFKNIV**, был ранее предсказан в работе Аггарвала с соавторами в PLoS Biology 2013 стр.6: «Computer algorithms that predict aggregation-prone regions in unfolded protein chains [25] revealed two stretches within the MBP sequence that have a high β -aggregation propensity».

Как отмечают авторы в разделе Обсуждение, в цитируемой работе предсказан еще и второй мотив, **GILDSIGRFFSGDRGAPKR** (37-55 аминокислоты изоформы размером 21,5 кДа) и показана предрасположенность соответствующих пептидов к образованию фибрилл. Судя по фотографии, представленной на Рис 6 работы Аггарвала, пептиды второго мотива более уверенно образуют фибриллы по сравнению с обсуждаемым автором мотивом. Как можно объяснить, что автором выявлен и охарактеризован только первый мотив, хотя второй мотив предсказывают больше половины программ на Рис. 10?

Из обзора мы узнали, что «У мыши белок MBP представлен шестью изоформами, у крысы пятью, а у человека четырьмя», стр. 35. Изоформы MBP мыши представлены на Рис. 4. Для понимания теста на стр. 54, было бы полезным для читателя на Рис. 10 схематически изобразить изоформы этого белка крысы, какими экзонами они кодируются и пронумеровать соответствующие аминокислотные остатки, в дополнение к перечислению номеров экзонов в тексте. Это помогло бы и быстрому восприятию Рис.11. Кроме того, в тексте на этой странице нет важного сообщения, что проверку амилоидогенных свойств решили провести в гетерологичной системе экспрессии гена MBP в дрожжах. Читатель, знакомый с генетикой дрожжей начинает подозревать эту систему, увидев знакомые слова «ген *URA3*, штамм GT409», остальные читатели узнают об этом только из сухой констатации на следующей странице, а полное утверждение мы находим только на стр. 57. Результаты с дрожжами несколько противоречивы, не все конструкции, содержащие мотив **PVVHFFKNI** образуют агрегаты, и, таким образом, анализ нельзя считать исчерпывающим. В этой связи, читателя запутывают утверждения автора: на стр. 55 мы читаем «Однако, как показывают наши данные, укороченный C-концевой фрагмент (99-154 ак), также содержащий предсказанный алгоритмом регион, не формирует видимых агрегатов... (Рисунок 11)», а на стр. 57 «...за агрегацию белка отвечает последовательность, локализованная в рамках центрального региона с 60 по 119 ак». Получается, что важными для образования амилоидов являются аминокислотные остатки 60-99, а не только предсказанный мотив?

Стр 59-60. Хотелось бы узнать мнение автора, о чем говорит лишь умеренная колокализация MBP с окрашиванием амилоид-специфичными красителями?

В заключение отметим что общее впечатление от работы А.А. Шенфельда чрезвычайно положительное, что позволяет нам без сомнений утверждать, что 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 специальности 1.5.7. Генетика. Пункты 9 и 11 указанного Порядка диссертантом не нарушены.

Член диссертационного совета

доктор биологических наук, профессор
Юрий Иванович Павлов

Подпись



22 Августа 2022 года