

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

Актуальность.

Формирование в органах и тканях нерастворимых депозитов - амилоидов - приводит к развитию амилоидозов, группы тяжелых заболеваний разной этиологии. Однако как показывают последние исследования, образование амилоидов не всегда приводит к развитию патологии, а играет важную роль в различных физиологических процессах. Такие амилоиды обнаружены у многих организмов. Они получили название «функциональных», и список их постоянно растет. Несмотря на проводимые исследования, имеющихся на данный момент знаний о причинах и механизмах образования «функциональных амилоидов», недостаточно для понимания их роли в норме и при патологических состояниях. Соответственно, диссертационное исследование А.А. Шенфельда, посвященное идентификации белков формирующих амилоидные агрегаты в мозге крысы и изучение их свойств, чрезвычайно актуально и вносит вклад в развитии генетики амилоидов.

Научная новизна.

Впервые методом протеомного скрининга в мозге крысы выявлены белки-кандидаты на роль функциональных амилоидов: MBP, FXR1, NSF, STXB1 и RIMS1. С использованием широкого круга современных компьютерных, биохимических и гистологических методов показаны амилоидные свойства белка миелина MBP. Предложена последовательность, ответственная за агрегацию данного белка.

Теоретическая и практическая значимость работы определяется полученными фундаментальными сведениями о механизмах функционирования функциональных амилоидов. С практической точки зрения несомненный интерес представляют данные об амилоидной природе белка MBP и его роли в ЦНС крысы.

Достоверность и обоснованность положений и выводов диссертации.

Экспериментальные данные, лежащие в основе диссертационного исследования А.А. Шенфельда получены на большом материале, с использованием современных методов, адекватных поставленным задачам, грамотно статистически обработаны. Полученные данные были опубликованы в трех экспериментальных статьях в рецензируемых высокорейтинговых журналах. Достоверность представленных в диссертации материалов не вызывает сомнений.

Описание работы.

Текст диссертации А.А. Шенфельда построен классическим образом и включает в себя разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», «Список литературы (241 источник)», «Приложение». Диссертация изложена на 99 страницах русского текста с иллюстрациями и 86 страниц английского текста, содержит две таблицы и 16 рисунков.

Во «Введении» обоснована актуальность проведенного исследования, его научно-теоретическая и практическая значимость, четко и корректно сформулированы цель и задачи работы, научная новизна проведенных исследований.

«Обзор литературы» занимает значительную часть диссертации, достаточно строго структурирован, написан хорошим языком. В нем проанализированы данные, касающиеся классификации, структуры и механизмам образования амилоидов. Значительная часть обзора посвящена функциональным амилоидам у разных организмов. Детально рассмотрен процесс миелинизации у млекопитающих и свойства белка MBP, основного белка миелина. Обзор дает объективную картину состояния исследований на сегодняшний день по теме работы. *Однако ему не хватает некоторого общего заключения, которое бы логично обобщало изложенное и подчеркивало необходимость и важность проводимых диссертантом исследований.*

Глава «Материалы и методы» дает четкое представление об использованном методическом материале. Подробно описан, разработанный в лаборатории метод протеомного скрининга амилоидных белков, молекулярно-генетические методы, методы флуоресцентной, конфокальной и электронной микроскопии, гистологии. Оценка результатов проведена современными статистическими методами анализа, которые адекватны поставленным задачам. *В то же время отсутствует описание, использованной в работе линии крыс *Rattus norvegicus*, пола и возраста животных, условий их содержания, где они были приобретены.*

В разделе «Результаты» подробно представлены экспериментальные данные, отвечающие на поставленные задачи. В работе использован метод протеомного скрининга PSIA-HPLC-MALDI, ранее разработанный в лаборатории для поиска амилоидных и амилоидоподобных белков у дрожжей. Выявление белков MBP, FXR1, NSF, STXB1 и RIMS1 в мозге крысы, для некоторых из которых ранее были предсказаны амилоидные свойства, подтверждает универсальность данного метода.

Далее в работе автор концентрирует внимание на доказательстве амилоидных свойств одного из выявленных в скрининге белков, белка миелина - MBP. Используя большой набор современных методов (биоинформатический анализ, молекулярно-генетические, электронная микроскопия) А.А. Шенфельда показывает, что MBP в мозге крысы функционирует в амилоидной форме. Этот результат подтвержден и данными гистологического окрашивания с использованием тиофлавина С и Конго красный, которое на сегодняшний день является основным и общепринятым для подтверждения амилоидных свойств белков. Еще одним значимым результатом проведенного исследования является определение последовательности белка MBP, ответственной за его агрегацию *in vivo*. *С использованием биометрический подход AMYLPRED2, был выявлен амилоидогенный мотив PVVHFFKNI, располагающийся на участке с 109 по 117 аминокислоты изоформы 17.22 кДа. Использование комбинации молекулярно-генетических и гистологических методов показало, что амилоидогенный мотив расположен в границах последовательности с 60 по 99 аминокислоту, что противоречит данным биометрического анализа. Данное противоречие автор объясняет тем, что возможно последовательность PVVHFFKNI является лишь частью амилоидогенной последовательности и, следовательно, на основании результатов обоих экспериментов, за агрегацию данного белка отвечает участок, содержащий последовательность с 60 по 119 аминокислоту. В то же время автор предполагает, не без основания, что амилоидогенная последовательность может быть короче: с 86-*

й по 119 аминокислоту. Рассматривалось ли, что данные биометрического анализу могут быть не достаточно точными? И тогда последовательность, определяющая агрегацию, включает в себя более короткий фрагмент с 86-й по 98 аминокислоту.

Результаты проиллюстрированы микрофотографиями электронной, конфокальной и флуоресцентной микроскопии хорошего качества. *Немного путает разное написание красителя Конго красный на рисунке 14 и в подписи к нему. В то же время нет четких пояснений в тексте работы, сколько было использовано срезов, сделано повторностей опыта, числа животных, для анализа колокализации белка МВР с амилоид связывающими красителями на препаратах мозга.*

В главе «Обсуждение» на основе анализа результатов, полученных в ходе проведения диссертационного исследования и обобщения представленных в литературе данных А.А. Шенфельдом впервые предложена новая модель структурной организации компактного миелина, в состав которого входят амилоидные фибриллы белка МВР. *В качестве замечания: следует отметить, что значительная часть «Обсуждения» (до представления модели) фактически представляет собой не обсуждение полученных результатов, а их итоговое краткое изложение.*

Указанные замечания не снижают высокий научный уровень диссертационной работы Шенфельда Александра Анатольевича. В целом хочется отметить грамотную и четкую постановку проблемы, формулирование конкретных задач, адекватный анализ полученных экспериментальных данных. Выводы из диссертационной работы соответствуют поставленным задачам.

Заключение.

По теоретической и практической значимости результатов проведенного исследования, актуальности выбранной темы, научной новизне, достоверности и обоснованности научных результатов 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,

Зав. лабораторией экспериментальной генетики, заместитель директора по научной работе
Федерального государственного учреждения Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский
институт»,

доктор биологических наук

по специальности 1.5.7. (03.02.07) - Генетика

Саранцева Светлана Владимировна

23 августа 2022.



Саранцева С.В.

КАДРОВ ЗИНОВЬЕВА А.И.

23. 08. 2022