

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Матиива Антона Богдановича на тему «Агрегация адаптерного белка синтазы оксида азота 1 и его взаимодействие с α -синуклеином» представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика

Работа Матиива А.Б. посвящена исследованию одной из самых «горячих» тем в современной молекулярной медицине – изучению механизмов агрегации белков при заболеваниях нервной системы. В выборе темы исследования и заключается ее **актуальность**, как в чисто научном плане, так и в важности подхода для практического здравоохранения. Действительно, не смотря на многочисленные исследования и успехи, процессы, приводящие к развитию патологии, в частности при болезни Паркинсона и шизофрении остаются до конца неизученными. Возможно, именно по этой причине сегодня трудно найти радикальные методы профилактики и лечения этих заболеваний.

В «Обзоре литературы» автор кратко, но достаточно информативно знакомит с уже известными исследованиями по теме диссертации, анализируя данные, касающиеся классификации, структуры и механизмов образования амилоидов, строения и функций белков NOS1AP и альфа-синуклеина, их роли в развитии заболеваний человека. Значительная часть обзора посвящена функциональным амилоидам у разных организмов. В заключении обзора, автор обобщает изложенное и подчеркивает необходимость и важность проводимых им исследований.

Хочется отметить высокий методический уровень представленной работы. Для достижения поставленной цели, а именно «изучению возможности агрегации белка NOS1AP и его фрагментов, а также его способность взаимодействовать с альфа-синуклеином *in vivo* и *in vitro*» диссертант использует значительный арсенал современных методов молекулярной биологии, генетики, биоинформатики, микроскопии.

Фактически работу можно разделить на две части. В первой представлены результаты исследований непосредственно белка NOS1AP, для которого ранее были предсказаны амилоидные свойства, и его фрагментов. Описана логика деления последовательности данного белка на фрагменты и изучения их агрегации в различных модельных биологических системах: бактериях, дрожжах и культурах клеток. Интересно, что NOS1AP и его фрагменты (1–291 и 292–390) образовывали агрегаты в клетках HEK293T, однако в дрожжах агрегаты были детектированы при гиперэкспрессии только полноразмерного NOS1AP и его фрагмента 1–291. К сожалению, амилоидные свойства ни в одной использованной системе выявлены не были. Вторая часть работы посвящена изучению взаимодействия NOS1AP и его фрагментов с альфа-синуклеином. Впервые показана колокализация полноразмерного NOS1AP и его фрагменты (1–291 и 292–390) с альфа-синуклеином в клетках HEK293T и дрожжах и коагрегация альфа-синуклеина и фрагментов NOS1AP *in vitro*. Интересно, что мономеры фрагмента NOS1AP (292–390) ускоряли агрегацию альфа-синуклеина, а совместная инкубация последнего с фрагментами 292–390 и 391-506 приводила к образованию более длинных фибрилл альфа-синуклеина.

Краткое обсуждение полученных результатов, а также обоснование возможного молекулярного механизма агрегации NOS1AP в патогенезе шизофрении и болезни Паркинсона представлены в разделе «Обсуждение».

Достоверность и обоснованность положений и выводов диссертации. Экспериментальные данные, лежащие в основе диссертационного исследования Матиива А.Б., получены на достаточном для такого типа исследований объеме материала, с использованием современных методов, адекватных поставленным задачам, грамотно статистически обработаны. Основные результаты диссертационного исследования Матиива А.Б. были представлены на отечественных и международных конференциях. Полученные данные были опубликованы в 3 статьях в рецензируемых журналах. Достоверность представленных в диссертации материалов не вызывает сомнений.

Теоретическая значимость работы определяется полученными фундаментальными данными о свойствах и агрегации белка NOS1AP и его фрагментов. С **практической** точки зрения несомненный интерес представляют данные об коагрегации альфа-синуклеина и NOS1AP и его фрагментов.

Принципиальных замечаний по представленной работе нет. Однако при ознакомлении с диссертацией возникли некоторые вопросы.

- 1) На одном из первых этапов работы для анализа амилоидных свойств белка NOS1AP автор использует бактериальную экспресс-систему C-Dac. Эксперименты таких свойств выявили. По утверждению диссертанта: «Из-за полученных отрицательных результатов дальнейшие проверки в этой бактериальной системе были признаны нецелесообразными». Почему автор считает полученные результаты отрицательными, если в дальнейшем было подтверждено, что изучаемый белок не обладает амилоидными свойствами?
- 2) Вопрос выбора клеточной системы. Для исследования были выбраны две клеточные линии. Выбор клеточной линии НЕК293Т (клетки почки эмбриона человека) был обусловлен, по словам автора тем, что «...линия НЕК293Т относительно проста в культивировании и при осуществлении трансфекции...» и «...имеет много свойств недифференцированных нейронов [359]». Вторая линия IMR-32 (клетки нейроblastомы человека) показала низкую эффективность трансфекции, и практически не использовалась в экспериментах. В то же время автор изучает механизмы действия белков, нарушение работы которых приводит к развитию заболеваний, связанных с функционированием взрослой нервной системы.
- 3) В работе методом просвечивающей электронной микроскопии оценена агрегация альфа-синуклеина, а также коагрегация альфа-синуклеина и фрагментов NOS1AP *in vitro*, но не представлены микрофотографии агрегатов NOS1AP.
- 4) Не совсем понятна логика изучения изменения морфологии клеток линии НЕК293Т при сверхпродукции в них NOS1AP. Диссертант предположил, что возможная причина – это высокая токсичность сверхпродукции NOS1AP, приведшая к гибели клеток. Однако окраска трипановым синим (жаль, что данные не приведены) опровергла данное предположение. Далее исследована выживаемость клеток с помощью МТТ теста, который широко применяется в подобного рода исследованиях, является быстрым и достаточно надежным методом. Под «выживаемостью» автор понимает «количество выживших клеток» (см. п. 2.4.6., раздел «Материалы и методы»). МТТ-тест является метаболическим тестом и свидетельствует лишь о снижении жизнеспособности

клеток, но не отвечает на вопрос: действительно ли клетки гибнут и каким способом? Как правило, результаты МТТ-теста подтверждаются экспериментами оценками клеточной гибели, что автор уже сделал ранее, показав, что клетки живые.

- 5) Незначительные замечания: повторение фрагмента текста на стр. 109, отсутствие масштабной линейки на рисунке 11, отсутствие указательных поясняющих элементов (стрелки, звездочки и т.д.) непосредственно на рисунках.

Сделанные замечания носят, в основном, дискуссионный характер и ни в коей мере не снижает научную ценность полученных в работе результатов. В целом хочется отметить грамотную и четкую постановку проблемы, конкретных задач, адекватный анализ полученных экспериментальных данных. Выводы соответствуют поставленным задачам.

Заключение.

По теоретической и практической значимости результатов проведенного исследования, актуальности выбранной темы, научной новизне, достоверности и обоснованности научных результатов диссертация Матиива Антона Богдановича на тему «Агрегация адаптерного белка синтазы оксида азота 1 и его взаимодействие с α -синуклеином» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете». Соискатель Матиив Антон Богданович 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

08 сентября 2023


Саранцевой С.В.
Подпись руки
ЗАВЕРЯЮ
НАЧАЛЬНИК УЧРЕЖДЕНИЯ
Федерального государственного учреждения
Петербургский институт ядерной физики
им. Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра
«Курчатовский институт»
Зинькина А.И.
08.09.2023
