

Утверждаю

Директор ИОГен РАН

Член корреспондент РАН

Докт. А.М. Кудрявцев



30.11.2022

ОТЗЫВ

**Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук
о диссертации Сулацкой Анны Игоревны «Амилоидные фибриллы:
структурный полиморфизм, устойчивость к внешним
воздействиям, цитотоксичность», представленной на соискание ученой степени
доктора биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.**

Работа Анны Игоревны Сулацкой посвящена анализу структурного полиморфизма амилоидных фибрилл, исследованию модели взаимодействия фибрилл с тиофлавином Т и изучению эффектов внешних воздействий на их структуру.

Актуальность. Связь работы с планом соответствующих отраслей науки и народного хозяйства.

Тема диссертации и полученные автором результаты безусловно актуальны, поскольку формирование амилоидных фибрилл связано с развитием целого ряда социально значимых заболеваний и выявление факторов, влияющих на их структуру и стабильность, может иметь не только фундаментальную, но и биомедицинскую значимость.

Новизна исследования и полученных результатов.

Автором получены новые результаты, подтвердившие гипотезу о мономерной модели связывания тиофлавина Т с амилоидами. Также показано, что *in vitro* альфа В кристаллин расщепляет не только фибриллы белка PrP млекопитающих, но и амилоидные фибриллы других белков. Более того, впервые показана зависимость этого процесса от кислотности. Установлено влияние ряда факторов на полиморфизм амилоидных фибрилл.

Значимость для науки и практики полученных результатов.

Полученные результаты безусловно значимы для дальнейшего исследования амилоидных фибрилл и факторов, контролирующих формирование и деградацию амилоидов. Особую фундаментальную значимость имеют результаты исследований взаимодействия тиофлавина Т с амилоидами, а также данные о чувствительности амилоидных фибрилл к внешним воздействиям и к протеолитическим ферментам.

Личный вклад автора.

Результаты экспериментальных и теоретических исследований, представленные в диссертации, получены лично автором или под его непосредственным руководством. Это подтверждается статьями, в которых Анна Игоревна является первым или основным автором. Всего автором опубликовано 23 статьи по теме диссертации.

Структура работы.

Работа написана по классическому плану и содержит раздел «Введение», главы «Обзор литературы», «Цель и задачи исследования», «Материалы и методы», а также главу «Основные результаты и их обсуждение». Объединение результатов и обсуждения в одну главу оправдано, поскольку это помогает читателю легче ориентироваться в сути и значимости излагаемых результатов. Эта глава разбита на подразделы, в каждом из которых представлены и обсуждены отдельные результаты. В конце диссертации приводятся необходимые разделы «Заключение», «Выводы», «Список сокращений», «Список основных публикаций автора по теме диссертации» и «Список литературы». Диссертация хорошо иллюстрирована: содержит много необходимых рисунков и таблиц. К структуре работы есть одно замечание общего характера. В разделе «Обзор литературы» основное место занимает описание методов исследования структуры амилоидных фибрилл. Вместе с тем, почти ничего не говорится о литературных данных, посвящённых изучению полиморфизма амилоидных фибрилл и факторов, влияющих на их структуру. Много литературных данных приводится в разделе «Основные результаты и их обсуждение», но здесь как раз имело бы смысл сделать основной акцент на обсуждении собственных результатов. Отмечу, что это замечание носит дискуссионный характер.

Основные вопросы и замечания к диссертации.

На страницах 14 – 15 в подразделе 1.1.2. «Формирование амилоидных фибрилл» автор верно приводит современные представления о структурных особенностях белков, способных формировать патологические амилоиды, но не обсуждает структурные особенности функциональных амилоидов.

Стр 19. «К амилоидозам, в частности, можно отнести нейродегенеративные заболевания, например, болезнь Альцгеймера (амилоидогенные белки: абета-пептид и тау-белок».

Болезнь Альцгеймера, также как болезни Паркинсона и Хантингтона, безусловно связаны с формированием цитотоксичных амилоидов, однако в связи со сложной этиологией этих заболеваний согласно классификации International Society of Amyloidosis (ISA) их не принято относить к амилоидозам. Предполагается, что амилоидогенез в данном случае может являться не первопричиной, а одним из важных этапов патологического каскада. Кроме того, *in vivo* амилоидная природа агрегатов гиперфосфорилированного белка tau пока не доказана.

Стр 29 – 31. В качестве дискуссионного замечания можно отметить, что при описании биоинформатических алгоритмов имеет смысл уточнить, что все эти методы удовлетворительно работают для предсказания амилоидных свойств коротких пептидов, но чаще всего бесполезны для предсказания амилоидных свойств полноразмерных белков *in vivo*.

На странице 37 автор пишет про краситель Конго красный : «...для связывания красителя и детектирования двулучепреломления необходимы высокие концентрации соли и щелочной pH (Brigger, Muckle, 1975)».

Не совсем понятно, как это утверждение соответствует многочисленным данным по успешному использованию Конго красного и анализу двойного лучепреломления на срезах тканей. Двойное лучепреломление после окрашивания Конго красным отмечается как при детекции патологических так и функциональных амилоидов. Это подтверждается данными, опубликованными в целом ряде статей, в том числе и наших. Более того, во всех этих случаях речь не идёт о высокой концентрации соли или pH.

Также не ясно, почему раздел 1.6.5. «Методы оценки размеров амилоидных агрегатов» (стр. 42) включает описание метода SDS-PAGE. При использовании этого метода белки кипятят с буфере в SDS и в большинстве случаев это приводит к диссоциации амилоидных фибрилл до мономеров. Таким образом, оценка размеров амилоидных агрегатов становится невозможной. Может быть, автор имел в виду SDS-AGE? Это метод, при котором белковые лизаты обрабатывают 1% SDS при комнатной температуре и без кипячения наносят на агарозный гель. Поскольку амилоидные протофибриллы устойчивы к такой обработке, на геле при наличии амилоидов выявляются высокомолекулярные шмеры.

На странице 93 хотелось бы получить более подробное пояснение, почему по мнению автора тиофлавин Т неприменим для исследований *in vivo*? Мне известны работы, в которых на срезах тканей успешно проводили колокализацию этого красителя с амилоидными белками.

Стр 132. Раздел 4.2.3. «Тестирование предложенной методики на примере исследования взаимодействия ThT с гидролитическим ферментом ацетилхолинэстеразой».

Из этого раздела остаётся не до конца ясным за счёт чего мономеры ацетилхолинэстеразы связывают ThT, и почему такое связывание нехарактерно для других неамилоидных белков.

Стр. 143, раздел «4.3. Структурное многообразие и полиморфизм амилоидных фибрилл». Автор исследует фибриллы лизоцима куриного яйца и говорит о том, что известны случаи наследственных форм амилоидоза, связанного с агрегацией мутантного лизоцима. Это справедливо, но амилоидогенез лизоцима в организме человека всегда провоцируется определёнными мутациями. Насколько можно экстраполировать данные, полученные при исследовании фибрилл интактного лизоцима *in vitro* на процесс амилоидогенеза, спровоцированного мутациями?

Стр 196 При описании амилоидных свойств вицилина можно делать ссылку не только на диссертацию А.А. Нижникова, но и на статью Antonets et al., 2020.

Стр 242 Не могу согласиться с утверждением автора «Долгое время существовало представление о том, что в норме белки с шаперонной активностью принимают участие только в предотвращении образования амилоидов». Классическая работа, показывающая что шаперон Hsp104 расщепляет фибриллы прионной формы белка Sup35 на олигомеры и обеспечивает тем самым стабильное воспроизведение цикла «расщепление – рост фибриллы», опубликована много лет назад (Kushnirov VV, Ter-Avanesyan MD. Cell. 1998; doi: 10.1016/s0092-8674(00)81216-7). С тех пор модель, постулирующая что Hsp104 расщепляет фибриллы и способствует тем самым их передаче из клетки в клетку, считается общепризнанной.

В разделе про эффекты α -В-кристаллина нет ссылки на работу (Sun et al., 2008. doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.053), выполненную в лаборатории доктора Ильи Баскакова. В этой работе было показано, что α -В-кристаллин расщепляет фибриллы PrP^{Sc} *in vitro*. Вместе с тем, очень интересны данные А.И. Сулацкой о том, что этот шаперон по крайней мере *in vitro* фрагментирует не только фибриллы прионного белка, но и других амилоидов. Также

интересными и новыми являются данные, показывающие что изменение кислотности может влиять на способность этого шаперона расщеплять амилоидные фибриллы.

Важен результат, согласно которому мономеры лизоцима не расщепляются трипсином, тогда как амилоидные фибриллы этого белка чувствительны к трипсинолизу. Это наблюдение ставит под сомнение распространённое представление о том, что все амилоиды имеют повышенную устойчивость к действию протеолитических ферментов.

На рисунке 4.149 (стр. 288) по какой-то причине не показаны карманы геля, в которых должен выявляться фибриллярный белок, устойчивый к обработке SDS при комнатной температуре.

Есть замечания к разделу «Заключение». Непонятно, почему в этом разделе автор не делает заключений по своим результатам, посвящённым исследованию модели взаимодействия тиофлавина Т с амилоидными фибриллами. Это большая и значимая часть работы.

Заключение 1. «Представления об амилоидных фибриллах как об идентичных по своей структуре белковых агрегатах со стандартной регулярной укладкой должны быть пересмотрены».

Я не могу согласиться с тем, что согласно современным представлениям амилоиды являются идентичными по своей структуре белковыми агрегатами. Показаны различные структуры, известны разные варианты фибрилл одного и того же амилоидного белка. Известны три основных варианта организации амилоидных фибрилл (параллельная в регистре, антипараллельная и структура типа «хеликс»). Все эти данные были обобщены в обзорных статьях. В частности, обзорная статья в журнале FEBS J 2005-го года (Makin and Serpell, 2005 FEBS J. doi: 10.1111/j.1742-4658.2005.05025.x) цитируется более 500 раз. Правильнее было бы сказать, что полученные автором результаты поддерживают современные представления о многообразии структурной организации амилоидных фибрилл.

Заключение 2. «Высокая цитотоксичность характерна далеко не для всех амилоидных фибрилл».

С этим нельзя не согласиться, однако это очевидно. Об этом в частности говорят статьи, в которых идентифицированы функциональные нетоксичные амилоиды млекопитающих.

Вероятно, автор имел в виду исследование цитотоксичности амилоидных фибрилл, полученных в данной работе *in vitro*?

Заключение 5. «Фрагментация амилоидных волокон может являться не только важным этапом в распространении и наследовании прионов в дрожжах, но также может быть задействована в развитии амилоидозов у млекопитающих».

Возможно, автору следовало использовать несколько иную формулировку. Как уже упоминалось, данные о том, что шаперон α -В-кристаллин фрагментирует фибриллы прионного белка млекопитающих, были получены ранее в лаборатории Ильи Баскакова (Sun et al., 2008. doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.053). Это заключение выглядело бы более корректно, если бы в нём говорилось о том, что шапероны могут фрагментировать не только прионные (т.е. инфекционные) фибриллы, но и неинфекционные амилоидные фибриллы.

Выводы работы не вызывают сомнений, есть только уточняющие вопросы к формулировкам. Вероятно, вывод 5 касается данных полученных автором по конкретным фибриллам амилоидных белков, использованных в работе? Для некоторых других белков влияние аминокислотных замен и изменения длины аминокислотной последовательности на структуру амилоидных фибрилл было показано ранее (см. статьи: Chiba et al., 2003; doi: 10.1074/jbc.M304473200; Colletier et al., 2011. doi: 10.1073/pnas.1112600108). Аналогичный вопрос возникает к выводу 8. Автор имеет в виду взаимосвязь цитотоксичности и структуры амилоидных фибрилл, которые исследовались в данной работе?

Рекомендации по использованию результатов работы.

Результаты, полученные автором, могут быть использованы при чтении лекций студентам биологических факультетов МГУ, СПбГУ и других университетов нашей страны в курсах, касающихся анализа структуры белка и надмолекулярных структур, а также в курсах, непосредственно посвящённых изучению прионов и амилоидов. Так например, данные об эффекте α -В-кристаллина на фрагментацию амилоидных фибрилл могут быть включены в материалы курса «Прионы и амилоиды» для магистров биологического факультета СПбГУ.

Заключение.

Диссертационная работа Анны Игоревны Сулацкой на тему «Амилоидные фибриллы: структурный полиморфизм, устойчивость к внешним воздействиям,

цитотоксичность» является законченным в рамках поставленных задач научно-квалификационным исследованием, в котором на основании выполненных автором исследований разработаны теоретические положения, совокупность которых можно квалифицировать как крупное научное достижение в области молекулярной биологии.

Диссертационная работа А.И. Сулацкой полностью удовлетворяет требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 года (ред. от 11.09.2021), предъявляемым к докторским диссертациям по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология; А.И. Сулацкая заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Отзыв ведущей организации подготовлен Врио директора Санкт-Петербургского Филиала Института Общей генетики РАН, доктором биологических наук Алексеем Петровичем Галкиным. Отзыв был обсужден на семинаре Санкт-Петербургского Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук 23.11.2022 года, протокол № 4.

Врио директора СПбФ ИОГен РАН,
Доктор биологических наук
25.11. 2022

А.П. Галкин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Адрес: 119991, ГСП-1 Москва, ул. Губкина, д. 3

Тел.: (499) 135-62-13

E-mail: iogen@vigg.ru



УЧЁНЫЙ СЕКРЕТАРЬ

Д. Б. Н

ГОРЯЧЕВА

И.И.