

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Сорокиной Светланы Анатольевны на тему "Особенности взаимодействия катионных пиридилфениленовых дендримеров с амилоидогенным белком", представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.06 – Высокомолекулярные соединения и 03.01.04 – Биохимия

Актуальность темы диссертации

Разработка подходов для подавления агрегации белков представляет собой важное перспективное направление современной медицины. Особое место занимает амилоидная агрегация белков, приводящая к образованию амилоидных фибрилл и к развитию тяжелых нейродегенеративных заболеваний (таких, например, как болезни Альцгеймера, Паркинсона и ряд других), для многих из которых не имеется еще эффективных способов лечения. Особое значение при этом имеет поиск путей как для предотвращения такой агрегации, так и для разрушения уже сформировавшихся амилоидных агрегатов белков. На решение этой важнейшей проблемы направлены усилия множества лабораторий во всем мире, использующих для этого самые разные методы и подходы. Один из них – использование для этих целей химических полимеров (в частности – дендримеров), способных взаимодействовать с амилоидогенными белками, образовывать с ними прочные комплексы и предотвращать, хотя бы отчасти, агрегацию таких белков с образованием амилоидных фибрилл. В связи с этим не вызывает никаких сомнений актуальность работы С.А. Сорокиной, в которой проведено подробное исследование взаимодействия катионных пиридилфениленовых дендримеров с амилоидогенным белком – рекомбинантным овечьим прионом и выявлена способность таких дендримеров оказывать заметное влияние на амилоидную агрегацию этого белка.

Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы.

Важной особенностью работы является то, что в ней впервые было проведено подробное комплексное изучение взаимодействия катионных пиридилфениленовых дендримеров разного размера с амилоидогенным прионным белком. При этом был установлен механизм образования стабильных комплексов этого белка с дендримерами и экспериментально доказана принципиальная возможность использования пиридилфениленовых дендримеров не только для предотвращения белковой агрегации, но и для частичного разрушения уже сформировавшихся агрегатов (амилоидных фибрилл). Среди важных достижений следует также отметить то, что исследованная в работе цитотоксичность катионных пиридилфениленовых дендримеров оказалась ниже, чем у часто используемых поли(амидоаминовых) и поли(этилениминовых) дендримеров (в т.ч. и коммерческих). Достоверность полученных автором результатов не вызывает сомнений. На основании этих результатов автором работы было сделано 7 основных выводов, которые вполне адекватно отражают главные достижения диссертанта.

Оценка содержания диссертационной работы

Диссертация построена по достаточно традиционной схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, экспериментальной части, включающей описание материалов и методов исследования, заключения, выводов и списка цитированной литературы, включающего 249 ссылок. Работа изложена на 193 страницах и иллюстрирована 54 рисунками и 6 таблицами.

Во **введении** автором обоснована актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, ее научная новизна и практическая значимость, а также приведены иные необходимые формальные данные. Следует особо отметить, что уже здесь хорошо обосновано применение для решения поставленных задач именно катионных пиридилфениленовых дендримеров, выгодно отличающихся от иных дендримеров постоянством заряда и жесткостью структуры.

В **обзоре литературы** (глава 1) подробно рассматриваются современные данные о структуре, принципах синтеза и свойствах дендримеров различных классов. Особое внимание уделено рассмотрению особенностей взаимодействия дендримеров с белками и анти-амилоидных свойств дендримеров, т.е. их способности воздействовать на процесс амилоидной агрегации белков. При этом в обзоре рассматриваются молекулярные механизмы развития нейродегенеративных заболеваний и особое внимание уделено свойствам амилоидогенного прионного белка, что вполне закономерно, поскольку именно этот белок является главным объектом данного исследования. На основании анализа имеющихся литературных данных в конце обзора автором делается вывод о том, наиболее предпочтительным для подавления амилоидной агрегации белков является использование катионных пиридилфениленовых дендримеров, для которых характерны жесткость, постоянство заряда и отсутствие зависимости поведения в растворе как от свойств растворителя, так и от температуры и pH, что выгодно отличает их от дендримеров иных классов. В целом, обзор литературы производит очень хорошее впечатление. Он написан четко и логично, читается с большим интересом и наглядно свидетельствует о том, что диссертант хорошо ориентируется в имеющейся литературе по рассматриваемым вопросам.

Приступая к анализу главы **«Результаты и обсуждение»** (глава 2), хочу сразу отметить весьма четкое и логичное изложение материала диссертации. Все эксперименты сначала подробно обосновываются, а затем полученные данные подвергаются детальному анализу, так что возможность критических замечаний сводится к минимуму. Необходимо при этом отметить, что большинство главных разделов этой главы завершается краткими заключениями, в которых автор четко суммирует полученные данные и предлагает их возможную интерпретацию. Это, на мой взгляд, является важным достоинством рецензируемой работы.

Всю главу **«Результаты и обсуждение»** (глава 2 диссертации), состоящую из 6 разделов (разделы 2.1–2.6), можно условно разделить на две главные части. В первой из них, включающей разделы 2.1–2.2, описываются синтез используемых в работе катионных пиридилфениленовых дендримеров разного размера – дендримеров второй (G2), третьей

(G3) и четвертой (G4) генераций, и основные характеристики этих дендримеров, полученные методами динамического светорассеяния, спектрального анализа (анализ спектров поглощения), фракционирования в асимметричном потоке поля и молекулярной динамики. Не будучи большим специалистом в этой области исследований (химия дендримеров), я предпочел бы оставить анализ этой части работы на рассмотрение первого оппонента – специалиста в этой области.

Особый интерес (по крайней мере для меня!) представляют последующие разделы главы **«Результаты и обсуждение»** (разделы 2.3–2.6), в которых сначала подробно рассматриваются особенности взаимодействия дендримеров разных генераций (G2, G3 и G4) с нативным прионным белком с использованием самых разных методов (таких, как изотермическая титрационная калориметрия, спектроскопия кругового дихроизма, динамическое светорассеяние, флуоресцентный анализ, метод молекулярной динамики и др.) (раздел 2.3), а затем приводятся полученные автором данные о способности дендримеров подавлять процессы формирования олигомеров приона и их последующую агрегацию с образованием амилоидных фибрилл (раздел 2.4). В данной части исследования автором представлены данные, убедительно свидетельствующие о том, что катионные пиридилфениленовые дендримеры способны формировать прочные комплексы с овечьим прионным белком и предотвращать как формирование небольших, но наиболее токсичных амилоидных агрегатов – олигомеров, так и зрелых амилоидных фибрилл.

Немалый интерес вызывает и следующая часть главы **«Результаты и обсуждение»** (раздел 2.5). В этой части исследования показано, что катионные пиридилфениленовые дендримеры способны не только препятствовать образованию амилоидных фибрилл, но и разрушать уже сформированные белковые агрегаты амилоидной природы, приводя к высвобождению в раствор растворимых комплексов белок-дендример, причем способность разрушать белковые агрегаты возрастала с номером генерации и, как следствие, заряда дендримера. Следует отметить, что для получения этих результатов автором диссертации был использован целый ряд современных методов исследования, таких как иммунохимический и иммуноферментный анализ, динамическое светорассеяние и флуоресцентный анализ, включая флуоресценцию тиофлавина Т и флуоресцентную микроскопию телец включения с использованием тиофлавина S. Важность этих результатов для последующих исследований в данной области не подлежит никакому сомнению.

И, наконец, не менее важен и интересен последний раздел главы **«Результаты и обсуждение»** (раздел 2.6), в котором была исследована цитотоксичность катионных пиридилфениленовых дендримеров с использованием клеток меланомы MelL и нейробластомы, т.е. влияние дендримеров на выживаемость этих клеток (рис. 52). Оказалось, что дендримеры не оказывали влияния на выживаемость клеток лишь при небольших концентрациях (до 1 μM), но заметно подавляли ее при более высоких концентрациях, использованных в настоящей работе при исследованиях влияния дендримеров на агрегацию прионного белка с образованием амилоидных фибрилл. При этом, однако, катионные пиридилфениленовые дендримеры демонстрировали меньшую токсичность по сравнению с часто используемыми дендримерами других классов. Нельзя не согласиться с автором диссертации в том, что дальнейшие исследования в этом

направлении должны быть сосредоточены на снижении токсичности используемых дендримеров (в частности, путем модификации их поверхности).

В экспериментальной части работы (глава 3) достаточно подробно описаны методики синтеза катионных пиридилфениленовых дендримеров, способы их очистки, а также выделения и очистки рекомбинантного овечьего прионного белка. Особенно подробно описаны в методической части освоенные автором диссертации многочисленные методы исследования. Поражает обилие разнообразных методов и подходов, примененных автором диссертации для выполнения поставленных задач, – от различных биохимических методов исследования (электрофорез, в том числе и с использованием иммуноблоттинга, и т. д.) до современных методов физико-химического анализа белков – таких, как изотермическая титрационная калориметрия, спектроскопия кругового дихроизма, динамическое светорассеяние, различные флуоресцентные методы и др., а также методов флуоресцентной микроскопии, молекулярной динамики и фракционирования в асимметричном потоке поля. Такое успешное сочетание самых разных методов исследования является, безусловно, важной особенностью данной работы. Ознакомление с результатами проведенного исследования убедительно свидетельствует о том, что диссертант в совершенстве владеет всеми этими методами.

Вопросы и замечания по диссертационной работе.

Прежде всего следует отметить, что материал диссертации изложен хорошим языком, четко и логично, а количество обнаруженных опечаток совсем невелико. У меня возникло лишь несколько замечаний и вопросов к описанию результатов работы и оформлению диссертации, не имеющих, в общем-то, принципиального характера и не затрагивающих суть проведенного автором исследования и сделанных на его основе выводов.

1). В диссертации многократно (на стр. 45, 70, 83, 120, 162 и т.д.) упоминается динамическое *лазерное* светорассеяние (ДЛС). Это не совсем верно. В действительности, в исходной аббревиатуре (DLS) никакого "лазерного" нет, она означает *dynamic light scattering* (хотя лазер в этом методе действительно используется). В русской транскрипции "светорассеяние" пишется одним словом, хотя некоторые авторы используют иногда аббревиатуру ДСП, что, на мой взгляд, не совсем корректно. В общем это – дело вкуса, и замечание весьма несерьезное.

2). Стр. 73, подпись к рис. 23, где написано "Зависимость оптической плотности от длины волны..". Это неверно, на данном рисунке изображена зависимость оптической плотности не от длины волны при 280 нм, а от концентрации дендримера.

3). Стр. 79, рис. 27А,Б и подпись к нему на стр. 80, где написано: "белок окрашен согласно электростатическому потенциалу поверхности, при этом положительно заряженные области окрашены в синий цвет, отрицательно заряженные – в красный." По-моему, в данном случае было бы гораздо логичнее окрасить положительно заряженные области в красный цвет, а отрицательно заряженные области – наоборот, в синий. Но вообще-то это – дело вкуса.

4). Стр. 82, Рис. 29А и подпись к нему. При анализе данных, представленных на верхней панели этого рисунка, возникает вопрос: почему на этой панели, где приводятся значения RMSD на аминокислотный остаток для дендримера генерации G2, представлены сразу две зависимости, которые очень сильно отличаются друг от друга в области остатков 190-200? Это никак и нигде не объясняется - ни на самом рисунке, ни в подписи к нему, ни при его описании в тексте диссертации.

5). Стр. 100–101, Рис. 38. Здесь представлены спектры кругового дихроизма (КД), демонстрирующие влияние дендримеров разного размера (G2, G3 и G4) в разных концентрациях на изменение вторичной структуры прионного белка в ходе его олигомеризации. Из этих спектров хорошо видно, что дендримеры оказывают серьезное влияние на те изменения вторичной структуры данного белка, которые происходят при его олигомеризации. Возникает вопрос: а не пробовали ли, используя доступные программы, провести анализ полученных спектров КД, чтобы количественно определить изменения в относительном содержании α -спиралей, β -складок и неупорядоченного клубка при олигомеризации белка в присутствии и в отсутствие дендримеров?

Легко заметить, что все высказанные вопросы и замечания либо касаются оформления диссертации, либо носят сугубо полемический характер, нисколько не влияя при этом на общую высокую оценку выполненной С.А. Сорокиной диссертационной работы.

Опубликование результатов диссертации в научной печати

Материалы диссертации достаточно полно отражены в 12 публикациях; основные результаты опубликованы в международных рецензируемых журналах с достаточно высокими импакт-факторами – "Macromolecules" (5,9), "Macromolecular bioscience" (3,39), "RSC Advances" (2,93) и "Polymer" (3,48) а также доложены на многочисленных международных и отечественных съездах, симпозиумах и конференциях, включая конгресс FEBS (Прага, 2018).

Заключение

Подводя итоги, следует сказать, что С.А. Сорокина провела большое интересное исследование, в результате которого получены совершенно новые и безусловно приоритетные данные о возможности использования катионных пиридилфениленовых дендримеров для предотвращения агрегации белков и разрушения уже сформировавшихся белковых агрегатов (в том числе, и амилоидных фибрилл). Работа выполнена на высоком экспериментальном уровне, с привлечением большого числа современных методов исследования. Материал диссертации изложен четко и логично. В целом, рассматриваемая диссертационная работа наглядно свидетельствует о способности диссертанта как к творческому осмыслению получаемых результатов и их сопоставлению с имеющимися в литературе данными, так и к критическому анализу собственных результатов. Полученные данные имеют большое теоретическое и практическое значение для дальнейших исследований в этой области; достоверность полученных результатов сомнений не вызывает. Высказанные вопросы и замечания носят сугубо полемический

характер, нисколько не снижая при этом общего прекрасного впечатления от проделанной автором работы. Выводы, сделанные в диссертации, хорошо обоснованы. Представленный автореферат диссертации по содержанию полностью соответствует диссертации.

На основании изложенного считаю, что по всем критериям оценки диссертационная работа С.А. Сорокиной "Особенности взаимодействия катионных пиридилфениленовых дендримеров с амилоидогенным белком" полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям (пункт 9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор Сорокина Светлана Анатольевна заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.06 – высокомолекулярные соединения и 03.01.04 – биохимия.

Заведующий лабораторией структурной биохимии белка
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»,
(Института биохимии им. А.Н. Баха)
доктор биологических наук, профессор

Дмитрий Иванович Левицкий

Адрес: 119071 Российская Федерация, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2
Институт биохимии им. А.Н. Баха (ИНБИ РАН) при Федеральном государственном
учреждении «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук»
Телефон: (495)952-13-84; Факс: (495)954-27-32
Сайт: <http://fbras.ru> и <http://www.inbi.ras.ru>
e-mail: Levitsky@inbi.ras.ru

Подпись д.б.н., проф. Д.И. Левицкого заверяю

Ученый секретарь ФИЦ биотехнологии РАН,
кандидат биологических наук



А. Ф. Орловский

14 мая 2019 г.