

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Антона Александровича Нижникова на тему: «Особенности формирования и действия конформационных белковых матриц в протеомах прокариот и эукариот», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Диссертация Антона Александровича Нижникова «Особенности формирования и действия конформационных белковых матриц в протеомах прокариот и эукариот» посвящена решению следующих задач:

1. Выявить потенциально амилоидогенные белки в протеомах растений и провести экспериментальную проверку амилоидных свойств выбранных кандидатов.
2. Охарактеризовать комплексы потенциально амилоидогенных белков и идентифицировать амилоиды в протеомах симбиотических и патогенных видов протеобактерий.
3. Сравнить функциональные последствия прионизации белков на уровне экспрессии всего генома с эффектами инактивации соответствующих структурных генов.
4. Изучить влияние первичной структуры и уровня продукции на прионные свойства белков.

Актуальность темы. Амилоиды представляют собой агрегаты белков, которые имеют необычную структуру, состоящую из межмолекулярных бета-листов и стабилизированные многочисленными водородными связями. Указанная структура, называемая «кросс-β», придает амилоидам морфологию преимущественно неразветвленных фибрилл и уникальные физико-химические свойства, которые включают устойчивость к обработке ионными детергентами и протеиназами; связывание специфических амилоидных красителей, таких как тиофлавин Т, двойное лучепреломление в поляризованном свете при связывании с красителем Конго красный.

Биологическое значение амилоидов основано на двух аспектах: патологическом и функциональном. Отложение амилоида связано с развитием более 40 неизлечимых заболеваний человека и животных, включая различные типы амилоидоза и нейродегенеративные расстройства. Однако амилоиды могут быть не только патогенными, но и функциональными. Растущее число исследований показывает, что амилоиды играют жизненно важную роль в функционировании археев, бактерий и эукариотах, включая человека. Прокариотические амилоиды выполняют структурные (образование биопленок и оболочки) и запасующие (например, накопление токсинов) функции. У грибов инфекционные амилоиды, называемые прионами, контролируют несовместимость гетерокарионов, многоклеточность и лекарственную устойчивость. У животных образование амилоида важно для ряда функций, включая улучшение долговременной памяти, полимеризацию меланина, накопление гормонов и запрограммированный некроз.

Актуальность данной работы обусловлена, прежде всего, тем, что по сравнению с другими группами организмов, растения еще недостаточно изучены в области биологии амилоидогенеза. Следует отметить, что термин «амилоид» был впервые введен в 1838 году Матиасом Шлейденом для описания углеводов именно в растительных клетках, и только в 1854 году Рудольф Вирхов использовал его при описании патологических отложений белков в тканях человека. Первые исследования, проведенные в 1920-1950-х годах, привели к гипотезе о наличии так называемых «амилоидов» в семенах растений. Однако, эти структуры оказались ксилогликанами, основными полисахаридами матрикса клеточной стенки. Тем не менее, недавно было показано, что некоторые растительные белки или их участки образуют фибриллы с различными амилоидными свойствами *in vitro*. Всего в базе данных PubMed на апрель 2021 года по выражению «plant amyloids» обнаруживается свыше двух тысяч статей.

Актуальность избранной темы, избранной Антоном Александровичем Нижниковым, не вызывает сомнений, так как его диссертационная работа посвящена поиску ответов на ряд перечисленных ниже вопросов, ориентированных на понимание особенностей формирования и действия белковых конформационных матриц в растениях и микроорганизмах на протеомном уровне:

1. Какие потенциально амилоидогенные белки существуют в протеомах растений и какими амилоидными свойствами они обладают?
2. Какие амилоиды (и с какими свойствами) можно обнаружить в протеомах симбиотических и патогенных видов протеобактерий?
3. Есть ли связь между функциональными последствиями прионизации белков на уровне экспрессии всего генома и влиянием инактивации соответствующих структурных генов?
4. Каким образом реализуется влияние первичной структуры и уровня продукции на прионные свойства белков?

Степень обоснованности научных положений, заключения и рекомендаций. Научные положения, заключение и предложения по практическому приложению полученных результатов вытекают из результатов проведенных исследований, объективны и обоснованы. Достоверность научных положений подтверждается большим объемом научных исследований. Исследования выполнены методически грамотно с использованием большого арсенала компьютерных, протеомных, биохимических и молекулярно-биологических подходов. Автором изучены и проанализированы известные достижения и теоретические положения других российских и иностранных исследователей по вопросам, связанным с изучением амилоидных белков у растений и симбиотических бактерий.

Для анализа полученных материалов автором используются разнообразные биоинформатические и экспериментальные методы, позволяющие оценить роль матричных амилоидных структур с запасанием белков в семенах растений и надорганизменными взаимодействиями у симбиотических бактерий.

Оценка новизны и достоверности результатов, представленных в диссертации. К числу значимых результатов, представленных в диссертации, имеющих высокую степень новизны и достоверно обоснованных, относятся следующие:

1. Впервые идентифицирован функциональный амилоидный белок у растений, представляющий собой запасной белок семян посевного гороха *P. sativum* L. вицилин.
1. Впервые идентифицированы амилоиды у симбиотических бактерий, формируемые поринами наружной мембраны клубеньковой бактерии *R. leguminosarum* RopA и RopB.
2. Установлено, что эффекты прионизации белка не тождественны делеции его структурного гена, то есть прионизация может вызывать не инактивацию белка, а изменение его функции.
3. На примере транскрипционного регулятора Gln3 дрожжей *S. cerevisiae* показано, что белки, получившие название «условных прионов», приобретают и поддерживают прионные свойства только при уровнях продукции, отличающихся от естественных.

Анализ изложенного в диссертации материала показывает, что полученные автором научные результаты хорошо аргументированы и вытекают из объема фактического и экспериментального материала, полученного с использованием современных методов исследований, адекватны целям и задачам работы.

На основании объективного анализа экспериментального материала сделаны выводы, имеющие теоретическое и практическое значение. Экспериментальный материал качественно обработан статистически и не вызывает сомнения в его достоверности.

Практическая значимость работы. Практическую ценность представляют, прежде всего, результаты, полученные автором, относящиеся к амилоидогенезу запасных белков семян, представляющих важный компонент рациона питания человека. Эти амилоиды могут, с одной стороны, влиять на пищевую ценность семян, а с другой – быть источником пищевых аллергий. Достоверность теоретических и практических результатов диссертации подтверждена 20 научными работами (5 – в журнале Биохимия, 15 – в зарубежных журналах), опубликованными в изданиях ведущих научных журналов, рекомендованных ВАК РФ. Основные результаты диссертации апробированы в докладах на более чем пятидесяти значимых международных научных конференциях и получили одобрение ведущих специалистов.

Содержание и оформление диссертации

Диссертационная работа изложена на 128 страницах компьютерного текста, содержит 25 рисунков, две таблицы и включает следующие разделы: введение, четыре главы, заключение, выводы и список литературы, который содержит 230 источников.

В главе 1 на 22 страницах изложено описание и результаты биоинформатического анализа и лабораторных экспериментов по изучению функциональных амилоидов растений. На основании полученных результатов делается вывод о том, что запасной белок

вицилин накапливается в семенах в виде амилоидных агрегатов. Обнаружено, что амилоиды вицилина токсичны для клеток грибов и млекопитающих, устойчивы к действию протеаз желудочно-кишечного тракта и присутствуют в консервированных семенах гороха.

Делается вывод о том, что амилоиды, содержащиеся в семенах, вряд ли токсичны для человека при употреблении в пищу, поскольку их концентрации намного ниже, чем в условиях *in vitro*, которые были использованы для экспериментов по токсичности, но они могут вызвать тяжелую пищевую аллергию. Автор отмечает, что вицилин – один из самых сильных аллергенов в продуктах на растительной основе. Обнаружен и описан эффект быстрой деградации амилоидов вицилина во время прорастания семян, позволяющий считать, что традиция замачивания семян бобовых перед употреблением в пищу, заложенная много веков назад, оправдана, и может значительно снизить количество запасных белков, содержащихся в семенах в амилоидной форме.

Сделан вывод о том, что белок купин, а также вицилины, полифункциональны и, помимо участия в формировании резервуара питательных веществ, они также выполняют функцию защиты растений от патогенов, благодаря своей лектиновой активности.

Обнаружена токсичность фибрилл для грибов, что говорит о том, что амилоидогенез запасных белков, помимо собственно запасующей функции, может потенциально опосредовать защиту семян растений от патогенов.

На основе результатов биоинформатического анализа протеомов ряда наземных растений, обнаружившего распределение амилоидогенных участков в белках этой систематической группы эукариот, после подтверждения экспериментальными данными, сделано предположение о том, что функциональный амилоидогенез запасных белков семян является консервативной характеристикой не только бобовых, но и наземных растений в целом.

В главе 2 на 17 страницах описаны результаты исследования амилоидогенеза и надорганизменных взаимодействий, в частности, растений с микроорганизмами. Сделан вывод о том, что устойчивые к детергентам амилоидогенные белковые фракции симбиотических и патогенных протеобактерий схожи по функциональному белковому составу и обогащены факторами вирулентности и белками, образующими β -бочкообразные структуры. Указано, что такие белки, представленные RopA и RopB из *R. leguminosarum*, являются настоящими амилоидами, участвующими в формировании систем симбионт-хозяин или надорганизм патоген-хозяин, в зависимости от специализации соответствующих бактерий. Сделано предположение о том, что прокариотических амилоидных белков, связанных с вирулентностью и патогенезом, на самом деле может быть намного больше, чем считается в настоящее время, этот вывод подтверждается, среди прочего, проведенными протеомными исследованиями и демонстрацией амилоидогенных свойств металлопептидазы из *E. coli* YghJ.

В главе 3 на 17 страницах дано описание результатов исследования факторов прионизации белков. Показано, что конверсия белка в прионы, выступающие в качестве конформационных матриц, преобразующих молекулы растворимого белка в агрегаты, не приводит к полной инактивации белка, а скорее влечет за собой изменение его функции. Сделано предположение, что прионы могут быть рассмотрены не как аналоги мутаций,

приводящих к потере функции, но как мутации, приводящие к образованию новой функции гена.

В главе 4 на 12 страницах дано описание результатов изучения условий, при которых белки приобретают свойства прионов и поддерживают их. Впервые описан прион белка Gln3, который сохраняется и передается в нескольких поколениях клеток только во время сверхпродукции.

В диссертации имеется общее заключение, в котором суммированы многочисленные результаты проведенного исследования и определено их место в изучении формирования и развития белковых амилоидов растений и симбиотических бактерий. Выводы диссертации в полной мере отражают ее содержание. Обоснованность и достоверность заключений и выводов, сделанных автором не вызывает никаких сомнений.

Необходимо отметить, что изложение материала диссертации логично, автор четко и понятно доносит свои мысли до читателя, работа написана хорошим академическим языком. Название диссертации полностью отражает комплекс проведенных исследований. Работа выполнена на высоком методическом уровне, а полученные результаты вносят значительный вклад, как в изучение биологического разнообразия белковых амилоидов, впервые идентифицированных автором у растений и симбиотических бактерий, так и в понимание закономерностей их формирования, поддержания и действия.

При знакомстве с настоящей диссертацией **возник один дискуссионный вопрос**. На странице 15 было указано, что «Новизна работы определяется тем, что в ее рамках впервые в мировой практике открыты амилоидные белки у растений...», хотя, например, одной из первых работ на тему амилоидов у растений является публикация Куймана «Amyloids of Plant Seeds» в Nature 1957 года, которая упоминает об амилоидах в семенах растений, ссылаясь, в свою очередь, на книгу Линсбаурера «Handbuch der pflanzenanatomie» 1922 года. Кроме того, уже в конце 20 века, в 1999 году, вышла публикация Konno T., Murata K., Nagayama K. Amyloid-like aggregates of a plant protein: a case of a sweet-tasting protein, monellin //FEBS letters. – 1999. – V. 454. – No. 1-2. – P. 122-126. В упомянутой публикации сообщалось о новом случае амилоидоподобной агрегации растительного белка монеллина, который, испытывает необратимую тепловую денатурацию при pH 2,5 и 85 °C. При добавлении 100 mM NaCl этот процесс сопровождается агрегацией белка. В этом случае агрегаты были структурированы как правильные волокна шириной примерно 10 нм и способны связываться с конго красным, подобно хорошо известным амилоидным фибриллам. Исследованный процесс амилоидной агрегации успешно контролировался калориметрическим методом. В упомянутой работе подтверждается универсальность амилоидоподобной агрегации, не ограничиваясь некоторыми специальными категориями белков. Следует, однако, подчеркнуть, что упомянутый вопрос никоим образом не снижает ценности рассматриваемой диссертационной работы и носит, как уже отмечалось, дискуссионный характер.

Заключение

Диссертация Антона Александровича Нижникова на тему: «Особенности формирования и действия конформационных белковых матриц в протеомах прокариот и эукариот» соответствует требованиям, установленным Приказом от 01.09.2016 № 6821/1 «О порядке

присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Антон Александрович Нижников заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика. Пункты 9 и 11 указанного Порядка диссертантом не нарушен.

Академик РАН, д.б.н, профессор,
научный руководитель Федерального
исследовательского центра Институт
цитологии и генетики СО РАН,
заведующий Отделом системной
биологии ИЦиГ СО РАН



подпись

Колчанов .Н.А.

Дата: 19.04.2021 г.