

## ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Нижникова Антона Александровича 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.

### **Актуальность темы диссертации**

Неисчезающий многие десятилетия интерес к изучению амилоидов вызван тем, что многочисленные заболевания человека и животных, называемые амилоидозами, сопровождаются патологической аккумуляцией амилоидных включений. Накопленные к настоящему времени данные позволяют констатировать изменение парадигмы «амилоид – патоген» и показывают, что эти белковые фибриллы как конформационные матрицы являются одним из важнейших вариантов функциональной четвертичной структуры белка. Протеомный подход, позволяющий рассматривать амилоиды как совокупность белков с различными последовательностями, но объединенных пространственной структурой, имеющей целый ряд общих черт, лег в основу исследований, выполненных в рамках настоящей диссертации.

**Целью** данного исследования было выявление новых особенностей формирования и действия белковых конформационных матриц на протеомном уровне.

Исследования в рамках этой цели были направлены на решение четырех **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.

Само же решение задач отражено в пяти выводах, иллюстрируемых четырьмя

### **Положениями, выносимыми на защиту:**

1. Впервые идентифицирован функциональный амилоидный белок у растений, представляющий собой запасной белок семян посевного гороха *P. sativum* L. вицилин.
2. Впервые идентифицированы амилоиды у симбиотических бактерий, формируемые поринами наружной мембраны клубеньковой бактерии *R. leguminosarum* PopA и PopB.
3. Установлено, что эффекты прионизации белка не тождественны делеции его структурного гена, то есть прионизация может вызывать не инактивацию белка, а изменение его функции.
4. 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.

Одно только перечисление положений, выносимых на защиту, свидетельствует о несомненной научной новизне, что в авторском изложении приведено ниже.

### **Научная новизна**

Новизна работы определяется тем, что в ее рамках впервые в мировой практике открыты амилоидные белки у растений и симбиотических бактерий, показана их связь с запасанием белка в семенах и надорганизменными взаимодействиями, соответственно. Установлено, что прионизация белка может приводить не к подавлению, а к изменению его функций. Описана новая группа белков, способных поддерживать прионные свойства в условиях продукции, отличающихся от нативных, названных «условными прионами».

### **Научно-теоретическое и практическое значение**

**Практическая ценность** работы обусловлена описанным амилоидогенезом 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 и обоснованность результатов**

Результаты диссертации апробированы в докладах на более чем пятидесяти значимых международных конференциях, включая конгрессы Вавиловского общества генетиков и селекционеров (2019, 2014), Федерации европейских биохимических обществ (2019, 2018, 2017), Американского общества клеточной биологии (2018, 2017), Федерации биохимических обществ Франции, Испании и Португалии (2015), Европейской ассоциации молекулярной биологии (2014), конгрессе по аналитической протеомике (2015), конференциях по генетике и молекулярной биологии дрожжей (2015, 2019), прионным белкам (2016), европейском симпозиуме по top-down протеомике (2019), BGRS/SB (2016, 2018, 2020), PLAMIC (2018), международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (2019, 2018, 2017), юбилейной конференции «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы» (2015) и целом ряде других мероприятий. Результаты работы представлены и обсуждены в 20 полнотекстовых статьях в журналах, индексируемых в международных базах данных. Соискатель внес основной вклад в планирование, получение и интерпретацию результатов диссертации. Личный вклад соискателя подтвержден тем, что почти во всех ключевых публикациях он является автором, ответственным за переписку или первым автором. Источником материала для исследования послужили уникальные генетические коллекции растений и бактерий (ФГБНУ «Всероссийский институт сельскохозяйственной микробиологии» (ФГБНУ ВНИИСХМ)), а также дрожжей (кафедра генетики и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ)). Протеомные исследования выполнены в центре «Развитие молекулярных и клеточных технологий» Научного парка СПбГУ, работы по секвенированию выполнены в центре коллективного пользования «Геномные технологии, протеомика и клеточная биология» ФГБНУ ВНИИСХМ.

Результаты, представленные в диссертации, получены при поддержке грантов Президента Российской Федерации (МК-3240.2017.4, МК-4854.2015.4), Российского научного фонда (17-16-01100П, 17-16-01100), Российского фонда фундаментальных исследований (17-04-00816, 16-34-60153) и Комитета по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга.

Диссертация, написанная на двух языках, русском и английском при безупречном владении стилем и грамматикой обоих языков включает введение, четыре главы и заключение; изложена на 128 страницах текста, содержит 25 иллюстраций, две таблицы и 230 ссылок на использованные источники литературы (русский вариант). Английский вариант в силу присущего языку более экономного словоупотребления содержит 118 страниц, но то же количество таблиц и ссылок. Методы, в том числе статистические, подробно описаны в многочисленных высокорейтинговых публикациях соискателя. При этом следует особо подчеркнуть, что **достоверность и обоснованность результатов** подтверждается тем, что каждая публикация – итог экспертиз двух или трех рецензентов. Кроме того, соискатель – лауреат Премии Правительства Санкт-Петербурга в области науки и техники им. Леонарда Эйлера и, совместно с К.С. Антонцом, лауреат премии Президента Российской Федерации в области науки и инноваций для молодых ученых за открытие амилоидных белков у растений и симбиотических бактерий (Указ размещен на сайте Кремля 8 февраля 2021 г).

### Замечания и вопросы

Впервые в моей многолетней практике рецензента и оппонента квалификационных работ на соискание различных степеней – нет замечаний. Есть лишь потребность еще раз, следуя законам жанра, а жанр диссертационной работы Антона Александровича Нижникова – это захватывающий детектив в духе Агаты Кристи с полагающимися завязкой и развязкой, восхититься сюжетом его детектива «Прионы». В завязке следует мудрое замечание о том, «что амилоиды могли быть одним из древнейших вариантов структурной и функциональной организации биологических макромолекул на заре формирования жизни на нашей планете [Mauru, 2009; Mauru, 2018]». И тому подтверждением – постепенно возникающее осознание того, что прионы не только патогены, и причина, и триггер многих нейродегенеративных заболеваний. Прионы играют важную роль в обеспечении нормальных физиологических процессов. Это было трудно осознать, покуда объектами изучения были дрожжи и в некоторых случаях растения. Но Закон гомологических рядов наследственной изменчивости Н.И. Вавилова на то и закон, что впервые ген раннего начала болезни Альцгеймера, присенелин APOE4 был выделен Е. Рогаевым (Rogaev *et al.*, Nature, 376(6543):775-8, 1995) у маленького растения *Arabidopsis thaliana*, в наши времена объекта студенческих курсов кафедры генетики и селекции ЛГУ. Растеньице из пробирки не убежит, а следовательно и не проявит симптом болезни Альцгеймера – потери способности ориентироваться в пространстве. Но за эти годы как пишет соискатель «накопленные ... данные позволяют констатировать изменение парадигмы «амилоид – патоген» и показывают, что эти белковые фибриллы как конформационные матрицы являются одним из важнейших вариантов функциональной четвертичной структуры белка».

Действительно, благодаря Эрику Кэнделу (см. обзор Rayman and Kandel, **Functional Prions in the Brain**. *Perspect Biol* . 2017, 9(1):a023671) мы знаем, что прион-подобные агрегаты cytoplasmic polyadenylation element-binding protein (CPEB) необходимы для обеспечения синаптической пластичности и формирования долговременной памяти.

Интересно, что первые репринты его работ мне дал по собственной инициативе консультант диссертационной работы академик РАН С.Г. Инге-Вечтомов. Теперь стало ясно, что функциональные амилоиды обнаружены во всех таксономических группах, от бактерий до млекопитающих, и обе команды – СПбГУ и Института физиологии им. И.П. Павлова РАН (лаб. Сравнительной генетики поведения, зав. Н.Г. Камышев) объединилось на прионно-амилоидном поле (Functional Mammalian Amyloids and Amyloid-Like Proteins. *Life* (Basel). 2020 Sep; 10(9): 156).

Но вернемся к детективу «Прионы», в развязке, автор повествует (иначе не скажешь, это действительно повествование), что «В настоящем исследовании впервые описаны функциональные амилоиды у растений. Так, в результате биоинформатического анализа протеомов 75 видов наземных растений установлено, что эволюционно консервативные запасные белки семян 7S-глобулины обогащены амилоидогенными участками у большинства растений. Амилоиды вицилина накапливаются по мере созревания семян, а затем разбираются при прорастании, вероятно, путем ограниченного протеолиза... Впервые показано, что амилоидогенез является физиологическим механизмом, контролирующим запасание белка в семенах растений... Нельзя исключать, что в случае действия биотических и абиотических стрессовых факторов или каких-либо иных воздействий уровень продукции белков, составляющих эти комплексы, мог бы меняться, и их компоненты приобретали бы свойства условных прионов...» Великолепное владение автором драматургией изложения его исследования и полученных результатов не позволяет говорить о каких-либо замечаниях, равно как и постановке вопросов. Последнее происходит потому, что при чтении всей работы любой возникающий у читателя вопрос находит ответ в следующем абзаце. Коль скоро так, то вопрос может быть только один, весьма экзистенциальный, для многих не корректный в силу историко-политических причин, но могущий быть исчерпывающе разъяснен автором.

Суть: Ваша работа это абсолютно современное изложение Закона гомологических рядов наследственной изменчивости Н.И. Вавилова.

Однако, Вы констатируете, что в результате биоинформатического анализа протеомов 75 видов наземных растений установлено, что эволюционно консервативные запасные белки семян 7S-глобулины обогащены амилоидогенными участками у большинства растений. Амилоиды вицилина накапливаются по мере созревания семян, а затем разбираются при прорастании... Нельзя исключать, что в случае действия биотических и абиотических стрессовых факторов или каких-либо иных воздействий уровень продукции белков, составляющих эти комплексы, мог бы меняться, и их компоненты приобретали бы свойства условных прионов.

Вопрос: если так, то не приближаемся ли мы на новом уровне знаний к яровизации Т.Д. Лысенко, изначально (согласно Википедия, другого мы не знаем, проблема не наших поколений) одобренной Н.И. Вавиловым, но потом, на марше мичуринской биологии, отвергнутой? Ведь это же реакция семян на стресс, у него – холодовой, у Вас HSP104?

Диссертация Нижникова Антона Александровича на тему: «ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ И ДЕЙСТВИЯ КОНФОРМАЦИОННЫХ БЕЛКОВЫХ МАТРИЦ В ПРОТЕОМАХ ПРОКАРИОТ И ЭУКАРИОТ» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 01.09.2016 № 6821/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Нижников Антон Александрович заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.02.07. – генетика. Пункты 9 и 11 указанного Порядка диссертантом не нарушен.

Член диссертационного совета

д.б.н., с.н.с.,

г.н.с., зав. Лабораторией нейрогенетики

Института физиологии им. И.П. Павлова РАН

Савватеева-Попова Елена Владимировна



«28» апреля 2021 г.