

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Качкина Даниила Валерьевича на тему: «Анализ амилоидных свойств белка РНС3 человека», представленную на соискание ученой степени кандидата наук по научной специальности 1.5.22. Клеточная биология

Диссертационная работа Д.В. Качкина посвящена исследованию амилоидных свойств белка РНС3, компонента репрессивного Polysomb комплекса участвующего в регуляции транскрипции. При переходе этого белка в амилоидную форму многие процессы в клетке могут изменяться, так, в некоторых видах рака встречается понижение активности комплекса. Мутации *PHC3* являются первопричиной наследственных заболеваний. Это определяет важность направления исследований данной работы. К сожалению, основные знания о РНС3 имеют отношение к полноразмерной форме, а значение укороченных изоформ, которые являются главной целью данной диссертационной работы, неизвестно. В результате важность поставленной темы работы остается не полностью раскрытой, может складываться впечатление, что основной целью было экспериментально доказать правильность предсказания амилоидогенности *in silico*. Хотелось бы услышать ответ автора на наши сомнения во время защиты.

Обзор литературы впечатляет и дает возможность понять проблематику амилоидов. Можно рекомендовать превратить эту главу в обзорную статью. Главному объекту работы - белку РНС3 внимания уделено меньше и осталось загадкой, почему важно исследовать его изоформы, так как нет информации об их относительной пропорции в разных тканях и на разных стадиях развития. В результате глава 1 кажется не полностью законченной в контексте диссертации. Некоторым недостатком нам кажется злоупотребление автором разнообразных неканонических вариантов цитирования, так, мы нашли: «цит. по» (даже в случаях, когда непонятно, какая конкретная работа имеется в виду в цитируемом источнике), «по», «по с модификациями», «см», «неопубликовано». В чем различия разных типов ссылок автором не объяснено. Процитированная в 2.7.4. работа Иноэ не встретилась нам в списке литературы.

Глава 2, где тщательно и с любовью описаны материалы и методы, отражает богатый арсенал методик, использованных автором в ходе работы. У нас есть мелкие замечания. В Табл. 2 источником одного штамма названа экспериментальная статья, а другого – компания, перепродающая штамм. Кроме того, в генотипе BY4742 после типа спаривания почему-то встроилась точка с запятой. Среда LB названа Lysogeny Broth, однако в иных источниках мы можем прочитать что “its creator, Giuseppe Bertani, intended LB to stand for lysogeny broth, but LB has also come to colloquially mean Luria broth, Lennox broth, life broth or Luria–Bertani medium. Что такое «постоянная» клеточная линия? Почему 4 из 9 выбрано как пороговое значение для оценки амилоидогенности (2.6)?

Глава 3 суммирует результаты исследований. Сначала автор провел биоинформатический поиск возможных амилоидогенных районов в полноразмерной изоформе РНС3 и в коротких изоформах 5 и 6. Потенциальные участки найдены каждым из трех вариантов. Автор пишет, что это свидетельствует о высоком амилоидогенном потенциале вариантов, но не ссылается на критерии, как этот потенциал измеряется, или на примеры, сколько таких участков находят программы у известных амилоидов. В следующей части автор

увидел способность к агрегации всех трех вариантов РСНЗ слитых с YFP в дрожжах *in vivo* и доказал биохимически, что агрегаты устойчивы к детергентам, что является одним из свойств амилоидов.

Следующим этапом был анализ агрегации коротких форм 5 и 6 в бактериальной системе C-DAG. Полученные изображения (северное сияние?) впечатляют и подтверждают амилоидную природу изоформ 5 и 6. Автор в этом разделе не объясняет, почему полноразмерная форма исключена из анализа. Это заставляет нас вспомнить, что о биологическом значении изоформ 5 и 6 пока ничего не известно, и, следовательно, неясно, какую роль может играть их способность к образованию амилоидов.

В четвертом чрезвычайно коротком подразделе автор приводит результат иммуноцитохимического исследования клеток человека линии HEK293T и сообщает, что полноразмерная форма РСНЗ образует «множественные скопления», что совпадает с данными литературы. Так как это было описано в 2007, нам не хватает замечания о важности данного наблюдения для диссертационной работы.

В подразделе 5 и 6 исследовано, образуют ли агрегаты в клетках HEK293T изоформы 5 и 6 (полноразмерная форма опять оставлена без внимания). Для этого сконструированы клетки с векторами экспрессирующими химеры изоформ с EGFP. В контроле с EGFP (который, к сожалению, не представлен на фотографии на Рис. 17) клетки с агрегатами встречаются в 1%, с вариантами 5 и 6 – около 30%. Для выяснения, являются ли агрегаты амилоидами, проведен анализ их устойчивости к детергентам двумя биохимическими подходами. Два – это хорошо, но возникает вопрос, почему в разделе 3.2. достаточно было только электрофореза в агарозном геле (SSD-AGE, рис 14). Что необычного обнаружено в клетках линии HEK293T, что потребовало электрофореза в полиакриламидном геле с последующим кипячением? В подразделе 6 не совсем ясно обоснован выбор трех дополнительных типов клеток человека для анализа. Интересно, что на рис 19 фото контроля с EGFP появилось (в отличие от рис 17), зато не приведены данные каков процент клеток с амилоидами. Заключительная фраза о том, что при сверхэкспрессии изоформы 5 и 6 превращаются в амилоиды вновь возвращает нас к размышлениям о биологическом значении и количества этих изоформ в клетках. Если это количество небольшое, как эксперименты с высоким уровнем продукции соотносятся с тем, что происходит в естественных условиях?

Подраздел 7 анализирует токсичность продукции изоформ 5 и 6 в клетках линии фибробластов DF2. На рис 20А странным для нас было увидеть те же самые фото клеток с изоформами, что и на рис. 19, а фото контроля - новое. Не совсем понятно, как эта панель иллюстрирует анализ токсичности. Мы также не увидели точного статистического значения разницы по выживаемости (автор пишет «значимо ниже»).

В подразделе 8 автор опять напоминает нам, что функции изоформ 5 и 6 неизвестны. В этом месте мы опять погрузились в размышления и стали искать в диссертации данные о распространении данных изоформ в клетке на разных стадиях цикла. Работу бы украсило выяснение доли изоформ 5 и 6 в разных тканях, или экспериментально, или биоинформатическим анализом данных РНК-seq разных тканей. Несмотря на эту неопределенность, данный раздел является самым интересным местом диссертации.

Автор предположил, что короткие формы РНС3 могут взаимодействовать с полноразмерной формой и провел эксперимент красивой эксперимент по ко-локализации разных форм слитых с разно-флуоресцирующими белками на дрожжевой модели. Оказалось, что изоформы и полноразмерный белок находятся в одном месте в клетке. В клетке. В следующем разделе автор перешел к исследованию вопроса о ко-локализации в клетках человека НЕК293Т, проверяя гипотезу, что агрегаты изоформ РНС3 могут мешать функционированию полноразмерного белка, например, препятствуя его попаданию в ядро. Применена модель высокой продукции EGFP-тагированных вариантов, а полноразмерный белок детектировали с помощью антител. Исследование показало, что РНС3 детектируется в 10% клеток и экспрессия изоформ не влияет на это, но наблюдается ко-локализация всех разных форм белка. Данные исследования при дальнейшем развитии могут быть весьма перспективными.

Последний, 10-й подраздел, изучает, как экспрессия короткой формы РНС3-5 слитой с EGFP (неясно, почему выбрана эта форма?) влияет на дифференциальную экспрессию генов. Выявлены гены, изменяющие экспрессию, это интересный результат. Авторы, правда не скрывают, что ожидания были другими: предполагалось, что экспрессия РНС3-5 будет влиять на работу гораздо большего числа генов. Контролем служила повышенная экспрессия РНС3, но автор не детализирует результаты анализа коротких прочтений, а ведь экспрессировали только изоформу 5.

Обсуждение работы выверенное и взвешенное, объясняет результаты работы. Отметим масштабный рисунок 24, позволяющий представить, как происходит регуляция работы полноразмерного РНС3. Выводы соответствуют проделанной работе.

Диссертация Качкина Даниила Валерьевича на тему: «Анализ амилоидных свойств белка РНС3 человека» соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Качкин Даниил Валерьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.22. Клеточная биология. Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не установлены.

Член диссертационного совета

Доктор биологических наук, профессор  Павлов Юрий Иванович

Дата 20 декабря 2022