

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Матиива Антона Богдановича на тему «Агрегация адаптерного белка синтазы оксида азота 1 и его взаимодействие с α -синуклеином», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7.- Генетика

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертация Матиива Антона Богдановича посвящена изучению адаптерного белка синтазы оксида азота 1 (NOS1AP), который по данным биоинформатического анализа является потенциально амилоидогенным и, возможно, способен взаимодействовать с α -синуклеином. Принимая во внимание, что образование амилоидов является причиной многих неизлечимых заболеваний человека, выяснение причин возникновения агрегатов белка и факторов, оказывающих влияние на амилоидогенез, является актуальной задачей. Выбор α -синуклеина в качестве белка-партнера NOS1AP обусловлен способностью α -синуклеина взаимодействовать как с белками, связанными с протеинопатиями, так и с белками, выполняющими различные функции в организме млекопитающих. Изучение свойств белка NOS1AP в клетках бактерий, дрожжей и млекопитающих позволит выявить общие закономерности и видовые отличия поведения и агрегации этого белка. В связи с вышесказанным диссертационная работа Матиива Антона Богдановича является весьма актуальной и своевременной.

Для достижения цели диссертации и решения поставленных задач автор использует интегральный подход, сочетающий методы генетической инженерии, биохимии, микроскопии, иммунохимического и биоинформатического анализа. Использование этих методов при работе с различными модельными системами (бактерии, дрожжи и культура клеток человека) позволило получить информацию, отличающуюся новизной и представляющую практический интерес.

Научная и практическая значимость работы

Результаты, которые получил Матиив А.Б., бесспорно, обладают научной новизной. Впервые показана способность белка NOS1AP образовывать устойчивые к детергентам агрегаты при сверхпродукции в клетках дрожжей и человека. При этом сверхпродукция NOS1AP оказывает токсическое действие на клетки НЕК293Т. Автором определены и картированы участки белка NOS1AP, склонные к агрегации. Впервые показано физическое взаимодействие белков NOS1AP и α -синуклеина в клетках дрожжей и человека. В экспериментах *in vitro* продемонстрировано, что фрагмент NOS1AP (от 292 до 390 аминокислоты) ускоряет агрегацию α -синуклеина. На основе полученных данных автор выдвигает предположение, что сверхпродукция белка NOS1AP сопровождается его агрегацией, которая приводит к не только к инактивации синтазы оксида азота, но и к коагрегации с α -синуклеином и ускорению образования амилоидных фибрилл.

Учитывая данные о том, что NOS1AP, возможно, связан с развитием шизофрении и некоторых других психических расстройств, а агрегация α -синуклеина рассматривается в качестве основного звена патогенеза болезни Паркинсона, полученные результаты будут способствовать выяснению новых деталей молекулярных механизмов развития этих заболеваний.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Обоснованность научных положений и выводов подтверждается приведенными результатами, которые получены при использовании различных современных методов, адекватных поставленным задачам, и статистически обоснованы. Основные результаты работы были представлены на четырех международных научных конференциях и опубликованы в международном и двух отечественных научных журналах, относящихся ко второму квартилю.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Матиива А.Б. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводов, списка цитированной литературы. Работа изложена на 159 страницах, иллюстрирована 36 рисунками и 8 таблицами. Список цитируемой литературы включает 373 источника.

Во введении автор подчеркивает актуальность проблемы, формулирует цель и задачи исследования, характеризует новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, приводит положения, выносимые на защиту и сведения о представлении полученных результатов.

Обзор литературы состоит из пяти основных глав. Первая глава посвящена истории открытия амилоидов, структуре и свойствам амилоидных агрегатов.

Во второй главе представлены сведения о многообразии амилоидов; рассматриваются амилоиды, связанные с развитием патологий, а также разные представители функциональных амилоидов.

В следующей главе приведены данные о структуре α -синуклеина, его функциях и факторах, способствующих агрегации этого белка, а также о способности агрегированного α -синуклеина передаваться от клетки к клетке.

Отдельная глава посвящена различным вариантам биоинформатического подхода для поиска потенциально амилоидогенных белков.

Пятая глава Обзора знакомит с адаптерным белком синтазы оксида азота (NOS1AP), его функциями и возможной ролью в возникновении психических заболеваний.

Наиболее важными для понимания логики проводимых экспериментов представляются разделы 1.2.1.3 - Нейродегенеративные заболевания; 1.3 – α -Синуклеин; 1.4 - Биоинформатический поиск потенциально амилоидогенных белков и 1.5 - Адаптерный белок синтазы оксида азота 1 (NOS1AP).

Обзор литературы отражает состояние исследований в рамках темы диссертационной работы, написан хорошим языком и хорошо иллюстрирован. Последняя глава Обзора – Заключение – кратко суммирует все вышесказанное и содержит обоснование настоящей работы.

В главе «**Материалы и методы**» представлены использованные в работе коммерческие и полученные автором плазмиды. Возможно, стоило привести карты коммерческих плазмид в Приложении. Эта глава также содержит сведения о штаммах бактерий, дрожжей, клеточных линиях млекопитающих, о средах и условиях их культивирования. Приводится подробное описание методов генетической инженерии;

различных вариантов клонирования интересующих последовательностей; ПЦР; секвенирования; электрофоретического разделения нуклеиновых кислот и белков; иммунохимического анализа; выделения белков из клеток бактерий, дрожжей и млекопитающих; флуоресцентной, поляризационной микроскопии; анализа кинетики агрегации белков. Все использованные методы адекватны поставленным задачам и свидетельствуют о хорошей методической подготовке автора.

В главе «**Результаты**», которая состоит из 4 разделов, представлены экспериментальные данные, позволившие автору решить поставленные задачи, получить новые интересные результаты, касающиеся амилоидных свойств белка NOS1AP, его способности образовывать агрегаты и взаимодействовать с α -синуклеином.

В первом разделе приведены результаты биоинформатического поиска участков NOS1AP, отвечающих за агрегацию. Автор использовал четыре разных программы, но окончательный выбор трех потенциально амилоидогенных фрагментов белка NOS1AP (1–291, 292–390, 391–506 аминокислоты) был сделан на основании результатов программы ArchCandy. Нуклеотидные последовательности, кодирующие эти три участка белка NOS1AP, были далее клонированы в плаزمиды, производных от pDONR221.

Следующий раздел посвящен исследованию образования агрегатов белка NOS1AP и его фрагментов в разных модельных системах.

В клетках бактерий (система C-DAG) ни полноразмерный белок NOS1AP, ни его потенциально амилоидогенные фрагменты не формировали агрегатов.

Для изучения агрегации белка NOS1AP и его фрагментов в клетках дрожжей *S. cerevisiae* использовали плазмиды, в которых интересующие последовательности, слитые с EGFP, находились под контролем сильного конститутивного промотора гена GAPDH. В клетках штамма 2-74D694 ([pin]) наблюдали образование агрегатов полноразмерного белка и фрагмента 1–291, но не фрагмента 292–390, который был выявлен в качестве амилоидогенного программой ArchCandy. Далее автор оценил влияние приона [PIN⁺] (агрегатов белка Rnq1) на формирование агрегатов белка NOS1AP и его фрагментов и показал, что присутствие агрегатов Rnq1 в клетках дрожжей не влияет на агрегацию NOS1AP и фрагментов 1–291, 391–506.

Анализ агрегации белка NOS1AP и его фрагментов в клетках млекопитающих (линия HEK293T), которые были трансфицированы плазмидами, содержащими интересующие последовательности, слитые с EGFP, под контролем сильного конститутивного промотора CMV, продемонстрировал появление агрегатов NOS1AP и его фрагментов 1–291 и, в отличие от клеток дрожжей, 292–390.

С помощью метода SDD-AGE автор продемонстрировал, что агрегаты NOS1AP устойчивы к детергентам, но чувствительны к обработке β -меркаптоэтанолом, что позволило сделать вывод о важности дисульфидных связей в поддержании высокомолекулярных образований. Далее автором было показано, что продукция NOS1AP оказывает токсический эффект на клетки млекопитающих.

В третьем разделе автор исследует взаимодействие белка NOS1AP и его фрагментов с α -синуклеином в клетках дрожжей и млекопитающих, используя для этого методы FRET и бимолекулярной флуоресцентной комплементации соответственно. Было показано, что в клетках дрожжей полноразмерный белок NOS1AP и его фрагменты 1–291, 292–390 колокализуются с α -синуклеином. В клетках млекопитающих наблюдали физическое взаимодействие как полноразмерного белка, так и всех трех фрагментов. Эти

результаты позволили предположить отсутствие специфического участка белка NOS1AP, отвечающего за взаимодействие с α -синуклеином. В дрожжевой системе экспрессии было продемонстрировано влияние аминокислотных замен в α -синуклеине на способность взаимодействовать с NOS1AP.

Следующий раздел посвящен изучению коагрегация фрагментов белка NOS1AP с α -синуклеином *in vitro*, что потребовало выделения и очистки α -синуклеина и фрагментов NOS1AP 292–390 и 391–506 из бактериальных клеток. Автором было показано, что сам фрагмент NOS1AP (292–390) не образует агрегатов, способных связывать тиофлавин Т. Но инкубация мономеров α -синуклеина с мономерами NOS1AP (292–390) изменяла время агрегации α -синуклеина. В присутствии фрагментов NOS1AP (292–390) и NOS1AP (391–506) α -синуклеин образовывал более длинные фибриллы. На основании полученных данных было сделано обоснованное предположение о том, что исследуемые фрагменты NOS1AP взаимодействуют с α -синуклеином и стабилизируют его агрегаты.

В главе «**Обсуждение**» автор анализирует полученные результаты, сопоставляет их с данными других исследователей и формулирует вывод о том, что взаимодействие белков, участвующих в развитии заболеваний, может являться причиной взаимосвязи патологических состояний человека. В частности, агрегация белка NOS1AP и его коагрегация с α -синуклеином может дестабилизировать работу нейрональной NO-синтазы, нарушить образование NO, в результате чего возможно развитие различных неврологических и нейродегенеративных заболеваний.

Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам, вытекают из проведенных экспериментов, четко сформулированы, аргументированы и достоверны.

При ознакомлении с диссертацией возник ряд вопросов и замечаний:

- 1 Что автор имеет в виду, говоря о «стрессе эндоплазматического ретикулума»? (С.41).
- 2 С чем связано использование разных вариантов переноса белков при иммуноблоте? В каких случаях использовали тот или иной вариант?
- 3 Диаметр пор концентратора не может выражаться в единицах молекулярной массы белка.
- 4 На с.79 автор указывает, что «центральная область (аминокислотные позиции 292–390) NOS1AP и его С-концевая часть (позиции 391–506) являются амилоидогенными, согласно Waltz». Результаты, приведенные на рисунке 10, этого не подтверждают.
- 5 Утверждение о том, что выбор участка NOS1AP 391–506, основан на результатах программы ArchCandy, также не подтверждается результатами на рисунке 10.
- 6 С. 82, рисунки 11, 12: Автор делает вывод, что NOS1AP и его фрагменты не формируют амилоидных агрегатов на поверхности клеток бактерий. Но ранее (с. 80) было отмечено, что одним из недостатков метода C-DAG является возможная проблема с секрецией бексов на поверхность клетки. Нельзя исключить, что белок NOS1AP просто не экспортируется на поверхность бактериальной клетки. Поэтому было бы интересно выяснить, как этот белок или его фрагменты ведут себя внутри клетки.
- 7 Как добивались сверхпродукции с конститутивными промоторами GAPDH (с. 84–85) или CMV (с. 87)? Можно ли говорить о сверхпродукции белка, опосредованной экспрессией целевого гена под контролем конститутивного (даже сильного)

промотора? Термины «сверхпродукция или сверхэкспрессия» используют при работе с регулируемыми промоторами, когда существует возможность изменять эффективность работы промотора и, соответственно, уровень экспрессии клонированного гена и опосредованно уровень продукции интересующего белка. Для того чтобы говорить о сверхпродукции белка в данных конкретных экспериментах явно требовались контроли с другими не столь сильными конститутивными промоторами. Кроме того, известно, что при сверхпродукции в клетках дрожжей белки могут образовывать нерастворимые агрегаты, не обладающие свойствами амилоидов. Поэтому было бы интересно оценить поведение интересующих белков, клонируя интересующие нуклеотидные последовательности под контролем более слабых промоторов.

- 8 Почему влияние приона [PIN+] на агрегацию оценивали только для фрагментов NOS1AP 1-291 и 391-506, но не посмотрели на поведение фрагмента NOS1AP 292-390, который является амилоидогенным согласно ArchCandy?
- 9 Как можно объяснить различия в способности фрагмента NOS1AP (292–390) образовывать агрегаты в клетках дрожжей и млекопитающих (рис.13 и 15)?
- 10 Почему при помощи SDD-AGE дрожжевых белков проверили только агрегаты полноразмерного NOS1AP, но не проанализировали агрегаты фрагментов белка? В первую очередь, фрагмента NOS1AP 1–291, который образовывал агрегаты как в клетках дрожжей, так и в клетках млекопитающих? (Рис. 18).
- 11 На электрофореграмме разделения агрегатов α -синуклеина заметно уменьшение количества мономерной формы после кипячения, но кажется, что уменьшилось и общее количество белка наносимой пробы? (Рис. 24 А).
- 12 Что является причиной отсутствия агрегации фрагмента NOS1AP (292-390) *in vitro* при наблюдаемой агрегации этого фрагмента в культуре клеток HEK293T? Почему NOS1AP и его фрагменты выделяли из бактерий? Ранее автор отмечает, что в бактериальных клетках может происходить неправильное сворачивание белка. Возможно, стоило получить дрожжевые продуценты интересующего белка и его фрагментов, по крайней мере, фрагмента NOS1AP (1–291), который образует агрегаты и в клетках дрожжей, и в клетках млекопитающих.

Высказанные замечания и вопросы, которые носят дискуссионный характер, не затрагивают основных результатов и выводов диссертации и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Диссертационная работа Матиива Антона Богдановича является научно-квалификационной работой, которая вносит существенный вклад в понимание механизмов амилоидогенеза, расширяет представления о возможной роли белок-белковых взаимодействий в образовании амилоидных агрегатов и предлагает молекулярный механизм развития шизофрении, основанный на агрегации NOS1AP. Полученные данные представляют интерес для специалистов в области молекулярной генетики, биохимии, молекулярной медицины.

Диссертация Матиива Антона Богдановича на тему «Агрегация адаптерного белка синтазы оксида азота 1 и его взаимодействие с α -синуклеином», соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения

ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Матиив Антон Богданович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7.- Генетика. Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не обнаружены.

Член диссертационного совета

Д.б.н., доцент, профессор кафедры генетики и биотехнологии



(Падкина М.В.)

Дата 14.09.2023