

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.

Рецензируемая работа изучает свойства и взаимодействия цитоплазматического белка NOS1AP взаимодействующего с нейрональной синтазой азота человека. Белок играет роль адаптора, определяющего привлечение синтазы к белкам-мишеням. Предсказана и доказана способность NOS1AP и его фрагментов при сверхпродукции образовывать агрегаты, устойчивые к детергентам. Показано что NOS1AP может взаимодействовать с α -синуклеином, который связан с болезнью Паркинсона, и ускорять его агрегацию. Известно, что агрегаты белков связаны с многими патологиями. Результаты работы позволяют строить новые гипотезы о механизмах развития заболеваний связанных с изменениями работы нервной системы.

Диссертация изложена на 159 страницах в двух вариантах, на русском и на английском языках. Половину объема в каждой версии занимает прекрасный и полный обзор литературы и список литературы. Обзор охватывает обширный материал, поднимает много проблем биологии и медицины; заставляет задумываться о сложности окружающего нас мира и лучше понять насколько важна тема диссертационной работы. Чуть менее одной пятой занимают Материалы и Методы. Результаты и их обсуждение составляют пятую часть от всего объема диссертации. Вопросы и замечания есть по Введению, Материалам и Методам, Результатам. Мы на них в основном и остановимся в этом отзыве, надеясь на то, что они помогут автору при оформлении дальнейших публикаций по материалам данной значительной работы.

Введение. Нам показалось, что результаты о возможных взаимодействиях α -синуклеина представленные на рисунке 1 (стр. 10) не совсем совпадают с перечислением уже выявленных взаимодействий на стр. 11.

Материалы и Методы. Раздел отражает превосходный методический уровень работы и разнообразие биологических моделей и молекулярно-генетически и клеточных подходов. В целом раздел помогает понять, как работа сделана и как можно воспроизвести результаты. Но есть некоторые некритические упущения.

Общие замечания. Нам показалось, что уровень описания очень неровный: некоторые содержат излишние подробности, а в иных, наоборот, упущены существенные для

воспроизведения данные. Например, для бактериальных твердых сред использовали 2,5-3% агар (с.58). Рецепты фирмы Difco рекомендуют 1,5%. Если ли особенности агара, который использовал автор? Что такое «заранее приготовленные химически компетентные клетки» (с.60), это закупленные в фирмах? На той же странице автор странно описывает манипуляции с ДНК, проводимые по «...методике фирмы Thermo-Fisher». Это огромная компания, продающая немислимое количество реагентов и китов; понятно, что методик тут много разных, хотелось бы конкретики. С другой стороны, автор скрупулезно, до мельчайших подробностей, описывает стандартные программы для ПЦР и обработку DpnI, как например на с.62, 64 и далее. Кроме того, есть повторы, например, автор уже написал, что селекция бактериальных трансформантов проводили на среде со 100 мг/л ампициллина (с.58), но напоминает нам об этом на с.66. И последнее: автор называет от кого получены те или иные материалы, но не всегда указаны места работы этих исследователей, что затрудняет понимание истоков материалов для читателя находящегося вне кафедры генетики СПбГУ.

с. 57, 2.2.1.1. «Штамм» или «штаммы» бактерий?

В разделе 2.4.5. было бы полезно указать, каким методом и на каком приборе было секвенирование.

В разделе 2.5.8. было бы интересным для читателя объяснить по какой причине варьировали концентрации блокирующего агента фирмы Amersham-Cytiva при инкубации с разными первичными и вторичными антителами (по протоколу компании, 2 - 5%, у автора от 0,2% до 2%).

Результаты. В целом, результаты изложены последовательно и описание экспериментов неплохо структурировано, хотя мы не всегда понимали почему в том или ином эксперименте использованы или не использованы контроли и экспериментальные конструкции. Это создает впечатление некоторой фрагментарности работы.

Первые три подраздела результатов описывают эксперименты по исследованию амилоидогенных свойств NOS1AP с помощью флуоресцентной микроскопии. В разделе 3.1 биоинформатически предсказаны потенциально амилоидогенные части белка NOS1AP. Описание рисунка 10 на с.79 не полностью соответствует графику; Waltz не предсказывает амилоидогенные структуры в правой части белка. К удивлению читателя, этот предсказательный по названию раздел заканчивается ссылкой на таблицу 1 из Материалов и Методов и утверждением, что сконструированные плазмиды проверены двумя методами, что повторяет фразу на с.53. В разделе 3.2.1 не обнаружено способности фрагментов NOS1AP к агрегации в бактериальной системе C-DAG. Отметим, что

доказательства, представленные на Рис. 11 и 12 понять трудно, или из-за схожести фотографий разных вариантов, или из-за слишком скупого сопровождения в тексте. Хорошо было бы направить внимание читателя (на что смотреть, на какие особенности обращать внимание?). Учитывая, что автор отказался от использования данной системы, мы не пытались разобраться в причинах отсутствия детектируемой агрегации, хотя, может быть, эти результаты могут помочь лучше разобраться в свойствах NOS1AP. Странной явилась последняя фраза раздела: вместо заключения автор неожиданно сообщает, что эксперименты были проведены в трех повторностях. В разделе 3.2.2, агрегатоспособность NOS1AP проверили в дрожжевой системе и предсказанные искомые свойства были найдены, хотя и тут не обошлось без непредвиденного. Фрагменты 1-291 и 391-506 формировали агрегаты, как и полноразмерный белок, а вот фрагмент 292-390 – нет, хотя все они предсказывались биоинформатически как потенциально амилоидогенные. Влияние приона Rnq1 на рис. 14 изучено/представлено не полностью, без контролей. Последняя фраза раздела опять вовсе не заключение и принадлежит или подписи к рисунку, или Материалам и Методам. В культуре клеток человека и 1-291 и фрагменты 292-390 обладали, судя по свечению, способностью к агрегации, 391-506 – нет (раздел 3.2.3).

Микроскопия не всегда однозначно свидетельствует о способности к агрегации, поэтому в разделе 3.2.4. проведено изучения устойчивости агрегатов к детергентам, характерного свойства амилоидов. Несомненным успехом автора является подтверждение, что NOS1AP образует устойчивые к SDS агрегаты при сверхпродукции в модельных системах дрожжей и клеток человека (Рис. 18). Не совсем понятно, почему в этих экспериментах изучены 4 варианта NOS1AP, полноразмерный и три фрагмента из клеток человека и только полноразмерный белок из дрожжей, ведь и N- и C-концевые фрагменты давали характерное свечение в предыдущих опытах. Добавление меркаптоэтанола разрушало агрегаты, подтверждая механизм их образования. Вывод этого раздела неожиданно упоминает об отрицательных результатах с бактериями и автор заключает, что по-видимому, NOS1AP не является амилоидом, но образует агрегаты устойчивые к детергентам. Агрегация приводит к снижению выживаемости клеток человека (3.2.5). Биологическое значение этого эффекта не очень ясно.

После вышеописанных экспериментов автор переходит к главному разделу работы – исследованию взаимодействия NOS1AP с α -синуклеином (Раздел 3.3). С помощью Bimolecular Fluorescence Complementation показано, что и полноразмерный NOS1AP и все три исследуемых фрагмента взаимодействуют с α -синуклеином в клетках человека (Рис.

20). Автор логично замечает, что маловероятно, что за взаимодействие отвечают специальные районы (вряд ли в NOS1AP есть три независимых участка связывания), поэтому представил планы будущих экспериментов, которые помогли бы разобраться в результатах этого подраздела. Далее автор исследовал колокализацию тех же белков в дрожжах и удалось, методом FRET, ее зарегистрировать для полноразмерного белка и двух исследуемых фрагментов. Отметим, что на рис. 21 мы впервые увидели стрелочки, направляющие внимания читателей на важные особенности фото. Они были бы полезны и на некоторых предыдущих рисунках. Авторам предложены интересные гипотезы о причинах отсутствия колокализации С-концевого фрагмента в дрожжах. Важным и эффективным элементом работы явилось изучение, как взаимодействуют варианты α -синуклеина с аминокислотными заменами, которые находят в наследственных случаях болезни Паркинсона. Выяснилось, что некоторые замены приводят к исчезновению колокализации. Это важное наблюдение, которое предстоит развить и осмыслить, в настоящей работе интерпретация данных результатов не очень глубока. Хотелось бы услышать, почему эти важные эксперименты проведены с дрожжами, а не с клетками человека, которые являются более адекватной моделью. Отметим, что нам показалась не очень удачной подпись к рис. 22.

Раздел 3.4 посвящен биохимическому анализу взаимодействия NOS1AP с α -синуклеином. Выделены большие количества чистого α -синуклеина и показано, что белок агрегирует *in vitro* и эти агрегаты являются фибриллярными образованиями которые связывают тиафлавин Т (ThT). На следующем этапе автору удалось очистить два фрагмента белка NOS1AP, к сожалению, не полноразмерный белок и N-терминальный фрагмент. Выяснилось, что один из выделенных фрагментов, 292-390, агрегатов *in vitro* не образует, а другой фрагмент почему-то не изучен. В разделе 3.4.4 проведен анализ кинетики агрегации α -синуклеина, и автором успешно преодолены многие методологические трудности. Далее изучена коагрегация фрагментов NOS1AP 292-390 и 391-506 с α -синуклеином. Добавление этих фрагментов ускоряло агрегацию и тяжи α -синуклеина удлинялись (Рис. 31,32). Это важный и знаменательный результат работы, хотя не ясно, какие контроли должны сопутствовать этому эксперименту для того, чтобы он оказался на сто процентов убедительным.

В интересном Обсуждении результаты работы всесторонне рассмотрены и предложена оригинальная модель роли NOS1AP в патогенезе болезни Паркинсона. Автор ясно видит какие исследования могли бы продолжить начатое в данной работе. Все же, подходы использованные автором в диссертации используют искусственно созданные (слитые или

тагированные белки, усиленную продукцию). Хотелось бы в ответах на вопросы услышать мнение автора о том, насколько эксперименты с свехэкспрессией моделируют процессы, происходящие в обычных условиях. В частности, настолько увеличение продукции NOS1AP в работе сравнимо с увеличением присутствия этого белка при шизофрении?

Диссертация Матиева 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 Матиев 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 установлены.

Член диссертационного совета

Доктор биологических наук, старший научный сотрудник, профессор



Павлов Юрий Иванович

Дата 18 сентября 2023