

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Данилова Лаврентия Глебовича на тему: «Изучение амилоидных свойств белков нуклеопоринов и влияния их агрегации на импорт макромолекул в ядро в клетках дрожжей», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7. Генетика

Работа посвящена исследованию амилоидных свойств нуклеоплорина NUP58 человека в гетерологичных системах и *in vitro*. Исследование функциональных и патологических амилоидов является актуальной задачей. Новизна исследования заключается в получении новых данных об амилоидных свойствах белка NUP58 человека в гетерологичных системах и *in vitro*. Цель и задачи исследования сформулированы корректно, выводы соответствуют поставленным задачам.

К тексту диссертации есть ряд замечаний.

1. Много раз в диссертации встречаются утверждения, что амилоидные свойства нуклеопоринов были показаны ранее или показаны в представленной работе. На самом деле все эти формулировки некорректны. Автор почти всегда умалчивает о том, что амилоидные свойства были показаны исключительно в гетерологичных системах, при искусственной сверхпродукции белка, или *in vitro*. Амилоидные свойства нативных нуклеопоринов в живой природе никто не показал. Именно это является самой актуальной и интересной задачей, которая до сих пор остаётся нерешённой. Это замечание относится практически ко всем разделам диссертации, за исключением «Материалов и методов».
2. В Обзоре литературы на странице 14 автор пишет:

«Для нивелирования токсичности амилоидных фибрилл и сохранения нормального функционирования клетки можно выделить следующие механизмы в клетке с функциональными амилоидами - ...»

Следует помнить, что не все фибриллы с кросс-бета структурой токсичны для клеток. Для таких амилоидов не надо нивелировать токсичность, так как её нет.

3. «При слиянии гиф двух штаммов [Het-S] и [Het-s] происходит реакция вегетативной несовместимости и гибель гетерокариона в месте слияния».

Автор забыл написать, что гибель гетерокариона происходит только в том случае, когда белок, соответствующий аллели [Het-s] представлен в прионной форме.

4. Стр 15. «К функциональным амилоидам также относят белок СРЕВ ...».

Приписывание прионных и амилоидных свойств этому белку - самый известный фейк. Амилоидные свойства для белка СРЕВ в нативных условиях в нейронах не доказаны. Авторы известной статьи в журнале Cell пишут, что не смогли доказать амилоидные свойства *in vivo*, но они думают, что это амилоид и прион. Магия имени основного автора этой статьи, а также журнала Cell сыграла плохую шутку. С лёгкой руки этих авторов все, кто смотрит только резюме, теперь повторяет, что СРЕВ является и

амилоидом, и прионом. На самом деле, амилоидные свойства чётко показаны для белка дрозофилы Orb2, который является ортологом CPEB.

5. Стр 17 «Более того, было показано, что белок A β взаимодействует с белком PrP в клетках дрожжей [130].»

Странно, что упоминается о взаимодействии этих белков в гетерологичной системе, но не говорится о том, что олигомеры A β связывают рецептор PrP на мембране нейронов в мозге млекопитающих.

6. Стр 17 «Инъекция фибрилл, полученных *in vitro*, или гомогената мозга больного животного приводила к усилению амилоидогенеза или индуцированию прионного перехода [101, 106].»

Эта информация ошибочная. В обеих работах речь идёт об инъекциях гомогената из мозга, а не фибрилл, полученных *in vitro*. Для справки – инъекция фибрилл, полученных *in vitro*, к развитию амилоидогенеза не приводит. Могу дать ссылки.

7. Стр 25 «В условиях *in vitro* многие FG-нуклеопорины в определенной концентрации образуют гидрогели, фактически воспроизводя структуру барьера проницаемости комплекса ядерной поры [49, 105]. Подобное фазовое разделение обусловлено амилоидоподобными взаимодействиями между нуклеопоринами.»

Сделанное заключение является гиперинтерпритацией. Нет доказательств «амилоидоподобных» взаимодействий нуклеопоринов *in vivo* в живых организмах.

8. Стр 27. К дрожжевым амилоидам можно отнести большую часть нуклеопоринов дрожжей, в том числе и белок Nsp1 [10].

Это вновь гиперинтерпритация. Ни для одного нуклеопорина дрожжей амилоидные свойства *in vivo* в нативных условиях не показаны. Раз таких данных нет – нельзя выдавать желаемое за действительность.

9. Стр. 29. «Для пациентов-носителей мутации характерно образование аномально длинных полиглутаминовых последовательностей в структуре хантингтина, что в совокупности влияет на токсическое усиление функции и агрегацию белка и в конечном итоге приводит к гибели нейронов [15].»

Мутантный белок Htt не агрегирует. Из него вырезается пролонгированная полиглутаминовая последовательность, которая агрегирует и формирует цитотоксические агрегаты.

10. Раздел «Материалы и методы» Стр 46. При описании методики SDS-PAGE с кипячением геля следовало указать, что перед началом фореаза пробы не кипятили.

11. Стр 48 Подраздел 2.8.6 «Вестерн-блот гибридизация».

Вестерн-блот не является гибридизацией, это лабораторный жаргон. Термин «гибридизация» используется в молекулярной биологии для обозначения связывания молекул ДНК или РНК по принципу комплементарности.

12. Стр 50 «Далее расчёт кумулятивного сора для каждой позиции осуществлялся посредством суммирования сора всех β -арок, в которых присутствовала данная аминокислота.»

Английскому слову «score» соответствует русское слово «счёт».

13. Стр 51 «Далее доля совпадающих аминокислот для каждой позиции рассчитывается при помощи скриптов, написанного на языке R доступных по ссылке».

Нет согласования в роде и числе.

14. Стр. 54. Раздел «Результаты». Рисунок 7. Для дальнейших экспериментов можно использовать лишь белок, очищенный не менее чем на 90%. Такие очищенные препараты белка на рисунке не представлены.
15. Стр. 55. Рисунок 8. Надо было подписать, что обозначает «+», а что «-».
16. Стр. 56. Рисунок 10. Разрешение рисунка очень низкое.
17. Страница 57. Описание рисунка 12. «Детальный анализ раствора NUP58 выявил две формы агрегатов, которые отличаются по размеру и устойчивости к ВМЕ»

К этому предложению два вопроса. Первый – что такое ВМЕ? Это бета меркаптоэтанол? В любом случае надо давать расшифровку. Второй вопрос – после обработки ВМЕ агрегатов нет, а остаётся лёгкое облачко чуть выше, чем расположены мономеры. Таким образом, агрегатов после обработки бета меркаптоэтанолом практически не остаётся. Как известно, это вещество разрушает дисульфидные связи. Получается, что высокомолекулярных агрегатов, устойчивых к последующей обработке лаурилсульфатом натрия, белок NUP58 не образует?

18. Стр. 66. Тяжи на картинке с NUP1-95 выглядят неубедительно.
19. Стр. 67. Описывая данные, представленные на рисунке 23, автор пишет: «Это означает, что конструкции NUP58₁₋₉₅ и NUP58₂₁₅₋₅₉₉ способны агрегировать в клетках дрожжей. Проведенный анализ показал отсутствие различий в частоте встречаемости агрегатов фрагментов белков нуклеопоринов в [PIN+] и [pin-] штаммах».

На самом деле на рисунке видно прямо противоположное. Белок NUP58₁₋₉₅ агрегирует в штамме [pin-] и почему-то не агрегирует в штамме [PIN+]. В названии рисунка автор говорит о том, что фактор [PIN+] влияет на агрегацию. Где правда? В выводе, на рисунке или подписи к нему?

20. Стр. 69. Какую информацию несёт таблица №7 и названия ортогрупп?
21. Стр. 71. «Белок Nup100 является белковым детерминантом хорошо описанного приона

[NUP100+] [59]».

Это грубая ошибка. Белковым детерминантом искусственного приона [NUP100+] является химерный белок, в котором фрагмент NUP100 слит с Sup35C. Прионные свойства нативного белка NUP100 не описаны, так что называть его хорошо описанным прионом нельзя.

22. Стр. 178. «Согласно полученным результатам, мы можем говорить, что наличие приона [PIN+] оказывает значимое влияние на частоту возникновения агрегатов фрагмента белка NSP1₁₋₁₃₆, в то время как для фрагмента белка Nup1₄₅₁₋₁₅₂ и остальных фрагментов такой зависимости не наблюдается (Таблица 9)».

Это заключение не соответствует данным, представленным на рисунке 29.

23. Стр. 79. «Так как белки нуклеопорины являются достаточно консервативными, и у некоторой их части сохраняются амилоидные свойства [31] нами было принято решение проанализировать влияние агрегации их фрагментов на ядерно-цитоплазматический транспорт».

Ни для одного нативного нуклеопорина *in vivo* амилоидные свойства не показаны.

24. Стр. 80 «Стоит отметить, что для человеческого нуклеопорина NUP58 нет прямых ортологов у дрожжей. Таким ортологом является белок NUP62. Однако белки NUP58 и NUP62 являются паралогами и выполняют схожие функции.»

Хорошо бы определиться – ортологи или паралоги?

25. Стр. 82. «В результате анализа было показано для белка spNup98₂₅₀₋₅₀₀ наличие приона [PIN+] влияет на показываемый эффект на транспорт (рис. 31, таблица 11).»

Предложение почти не воспринимается из-за ошибок.

26. Стр. 83. «Таким образом, мы можем говорить, что представленная система оценки ядерно-цитоплазматического транспорта зависит от присутствия фактора [PIN+], и наличие данного приона может оказывать влияние на ядерно-цитоплазматический транспорт в клетках дрожжей».

Сильное заключение. Может и оказывает, но только при искусственной сверхпродукции нуклеопоринов.

27. Стр. 85. «Описанные характеристики белка человека NUP58 позволяют считать его новым амилоидом».

Нет, не позволяют. В работе изучались амилоидные свойства этого белка только при сверхпродукции в гетерологичных системах, или *in vitro*.

28. Стр. 85. «Это может свидетельствовать о том, что образование амилоидов внутри ЯПК является функциональным и необходимо для регуляции ядерно-цитоплазматического транспорта.»

Учитывая предыдущие замечания, не вижу оснований для этой идеи.

29. Стр. 86. «Например, Nsp1, Nup42, Nup49, Nup57, Nup100 и Nup116 образовывали агрегаты *in vivo*.»

Автор в который раз не упомянул, что это было показано при сверхпродукции в гетерологичных системах.

30. Стр. 87. «Полученные результаты по амилоидным свойствам нуклеопоринов не позволяют сделать однозначного вывода о распространенности амилоидных свойств среди всех нуклеопоринов. Несомненно, такие свойства присущи большому количеству представителей этого семейства белков, однако для этого необходимо проводить больше экспериментальных проверок».

У меня сложилось противоположное мнение. Все проверки в гетерологичных системах и *in vitro* надо заканчивать (см. также заключительный комментарий рецензии). Они не могут дать ответ на основной вопрос – формируют ли нуклеопорины амилоидные агрегаты в природе?

31. Стр. 89. «Таким образом, на сегодняшний день нет однозначного механизма влияния агрегации нуклеопоринов на ядерно-цитоплазматический транспорт».

Вероятно, автор имел в виду, не то что механизма нет, а то, что такой механизм не известен.

Подводя итог рассмотрения диссертации, отмечу, что проведена действительно большая работа с использованием различных методов. На основании полученных результатов можно заключить, что белок NUP100 и его фрагменты при сверхпродукции в гетерологичных системах и *in vitro* демонстрируют амилоидные свойства.

Функционирует ли этот белок в амилоидной форме в живой природе? Это, на мой взгляд самый интересный вопрос, но диссертант по какой-то причине этого не изучал. Между тем, достаточно провести один эксперимент, который чётко покажет - является ли исследуемый нуклеопорин амилоидом *in vivo* в нативных условиях. Метод для такой проверки хорошо известен и успешно апробирован. Нужно провести иммунопреципитацию нуклеопорина из какой-либо ткани (доступные антитела для этого есть). После промывки нужно деликатно элюировать белок, не нарушая нативной структуры. Далее такой образец можно проанализировать на наличие фибрилл с помощью электронной микроскопии, а также оценить двойное лучепреломление после окрашивания Конго красным. Только такой подход позволит ответить на вопрос является ли исследуемый белок амилоидом в живом организме. Если да, то тогда уже имеют смысл эксперименты в гетерологичных системах и *in vitro*. Если нет, то можно опубликовать яркую статью и закончить эту долгую историю. Хотелось бы понять, почему не была проведена такая относительно несложная проверка амилоидных свойств *in vivo*?

Это моё личное мнение, а с формальной точки зрения проделана большая работа и получены результаты, которые опубликованы в рейтинговых научных журналах. С учетом всего вышесказанного полагаю:

Содержание диссертации Данилова Лаврентия Глебовича на тему: «Изучение амилоидных свойств белков нуклеопоринов и влияния их агрегации на импорт макромолекул в ядро в клетках дрожжей» соответствует специальности 1.5.7. Генетика;

Диссертация является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний.

Нарушений пунктов 9, 11 Порядка присуждения Санкт-Петербургским государственным университетом ученой степени кандидата наук, ученой степени доктора наук соискателем ученой степени мною не установлено.

Диссертация соответствует критериям, которым должны отвечать диссертации на соискание ученой степени кандидата наук, установленным приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете» и рекомендована к защите в СПбГУ.

Член диссертационного совета

Доктор биологических наук, доцент,

Директор СПбФ ИОГен РАН

25.12.2024.



Галкин Алексей Петрович