

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 *Saccharomyces cerevisiae*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7.- Генетика

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертация Данилова Лаврентия Глебовича посвящена изучению влияния особенностей структуры и конформации нуклеопоринов разных организмов на ядерно-цитоплазматический транспорт у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Ядерно-цитоплазматический транспорт (ЯЦТ), осуществляемый через ядерный поровый комплекс (ЯПК), играет важную роль в поддержании клеточного гомеостаза. ЯПК образован белками нуклеопоринами, которые взаимодействуют с белками-переносчиками - кариоферинами, а также способны обеспечивать определенную селективность транспорта молекул. Исследования последних лет показывают, что нарушение ЯЦТ является патологическим фактором старения и неврологических заболеваний. Молекулярные механизмы, лежащие в основе нарушения ЯЦТ и регуляции этого процесса, по-прежнему фрагментарны.

В связи с вышесказанным диссертационная работа Данилова Лаврентия Глебовича является весьма актуальной.

Для достижения цели диссертации и решения поставленных задач автор использует интегральный подход, сочетающий методы генетической инженерии, методы выделения и анализа белков и ДНК, разные варианты микроскопии, методы биоинформатики. Для изучения способности исследованных нуклеопоринов образовывать амилоидные агрегаты автор применяет бактериальную и дрожжевую систему экспрессии. Использование этих методов позволило получить информацию, отличающуюся новизной и представляющую практический интерес.

Научная и практическая значимость работы

Полученные Даниловым Л.Г. результаты обладают научной новизной. Автором впервые показано, что нуклеопорины различных организмов демонстрируют амилоидные свойства в клетках дрожжей и бактерий. Установлено, что участок с 1 по 213 аминокислоту нуклеопорина человека NUP58 необходим для формирования амилоидных агрегатов. Показано, что сверхпродукция фрагментов нуклеопоринов Nup98(250–500) *Schizosaccharomyces pombe*, Nup58(60–320) *Taeniopygia guttata* и Nup98(250–500) *Drosophila melanogaster* приводит к снижению импорта макромолекул в ядро.

Результаты диссертации расширяют представления о частоте встречаемости амилоидов, демонстрируют определенный консерватизм амилоидных свойств нуклеопоринов, позволяют предполагать роль амилоидообразования нуклеопоринов в регуляции ЯЦТ.

Полученные данные могут иметь важное значение для подтверждения взаимосвязи нарушений ЯЦТ и различных неврологических заболеваний, а также для определения молекулярных мишеней для терапии таких 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 4 международных научных конференциях и опубликованы в 3 рецензируемых научных изданиях.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Данилова Л.Г. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, которая включает материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводов, списка цитированной литературы. Работа изложена на 106 страницах, иллюстрирована 31 рисунком и 11 таблицами. Список цитируемой литературы включает 165 источников.

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

Обзор литературы состоит из пяти глав. Первая глава содержит краткие сведения об амилоидах. Во второй главе представлены данные о функциональных амилоидах и их биологических функциях. В третьей главе рассмотрены примеры патологических амилоидов. Четвертая глава посвящена различным методам идентификации амилоидов. В последней главе Обзора приведены сведения о нуклеопоринах, об амилоидных свойствах нуклеопоринов, о нарушениях ядерно-цитоплазматического транспорта и их роли в возникновении и прогрессировании нейродегенеративных заболеваний.

Обзор литературы достаточно полно отражает состояние исследований в рамках темы диссертационной работы, хорошо иллюстрирован.

В главе **«Материалы и методы»** представлены использованные в работе методы, приведены сведения о средах и условиях культивирования штаммов дрожжей и бактерий. 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.

В первом и втором разделах приведены результаты изучения нуклеопорина человека Nup58 и его фрагментов, синтезируемых в бактериальных и дрожжевых клетках. Полученные данные позволили автору сделать вывод о том, что Nup58 образует амилоидные агрегаты в использованных системах экспрессии, и что за амилоидогенные свойства отвечает N-концевой участок белка. Кроме того, было продемонстрировано, что агрегация Nup58 в клетках дрожжей не зависит от присутствия приона [*PIN+*].

Следующий раздел посвящен поиску ортологов нуклеопоринов NUP58 человека, Nup100 дрожжей и биоинформатическому анализу амилоидных свойств обнаруженных ортологов. Использование бактериальной и дрожжевой системы экспрессии

продemonстрировало способность нуклеопоринов tgNup5860-320, dmNup98250-500 и spNup98250-500 образовывать амилоидные агрегаты.

В заключительном разделе этой главы представлены результаты изучения влияния агрегации нуклеопоринов на ядерно-цитоплазматический транспорт. Эффективность ЯЦТ оценивали по отношению интенсивности флуоресценции белка GFP в области ядра клетки к среднему значению интенсивности флуоресценции ее цитоплазмы. Проведенные эксперименты показали снижение ЯЦТ при сверхпродукции нуклеопоринов и в случае присутствия приона [PIN+].

В «Обсуждении» автор анализирует полученные результаты, сопоставляет их с данными других исследователей, обсуждает способность нуклеопорина человека NUP 58 и исследованных нуклеопоринов других организмов образовывать амилоидные агрегаты, высказывает предположение о возможной роли таких агрегатов в обеспечении селективности ЯЦТ и предлагает возможный механизм влияния агрегатов нуклеопоринов на эффективность ЯЦТ.

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

При ознакомлении с диссертацией возник ряд вопросов и замечаний:

- 1 Автор утверждает, что «в ходе эволюции при изменении последовательности белка его склонность к агрегации могла сохраняться». Означает ли это, что речь идет о консервативности аминокислот в потенциально амилоидогенных участках белка?
- 2 Как соотносить маркеры молекулярной массы, приведенные на электрофореграмме слева и справа (рис. 11)?
- 3 Что автор имеет в виду, говоря о нарушении транспорта мРНК в ядро (с.88)?
- 4 Почему на рис. 26 Nup58 человека назван ортологом Nsp1 дрожжей, если далее отмечено, что «для человеческого нуклеопорина NUP58 нет прямых ортологов у дрожжей»?
- 5 Какие посттрансляционные модификации могут влиять на агрегацию белка, и насколько такие модификации белков отличаются у дрожжей и высших эукариот?
- 6 На с. 85 при обсуждении результатов автор отмечает, что «образование амилоидов внутри ЯПК является функциональным и необходимо для регуляции ядерно-цитоплазматического транспорта». Но представленные данные демонстрируют образование амилоидных агрегатов нуклеопоринов только в цитоплазме. Отсутствие результатов окрашивания клеток дрожжей DAPI пока не позволяет говорить о возможной агрегации исследованных нуклеопоринов в ЯПК.
- 7 Использование сильного промотора GPD для экспрессии интересующего гена приводит к сверхпродукции нуклеопорина и, как следствие, может приводить к его агрегации. Не пробовали ли использовать не такой сильный промотор как GPD для экспрессии интересующего гена?
- 8 Автор отмечает, что «агрегация нуклеопоринов является скорее аномальным процессом» Что является причиной такого преобразования белка и как это процесс регулируется?

Высказанные замечания и вопросы не затрагивают основных результатов и выводов диссертации и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Диссертационная работа Данилова Лаврентия Глебовича является научно-квалификационной работой, которая вносит существенный вклад в понимание механизмов ядерно-цитоплазматического транспорта, обеспечивающего клеточный гомеостаз, и расширяет представления о функциональной роли отдельных представителей нуклеопоринов в осуществлении этого процесса. Полученные данные представляют интерес для специалистов в области молекулярной генетики, молекулярной медицины.

Диссертация Данилова Лаврентия Глебовича на тему «Изучение амилоидных свойств белков нуклеопоринов и влияния их агрегации на импорт макромолекул в ядро в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*», соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Данилов Лаврентий Глебович 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 26 декабря 2024 г.