

## 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

Диссертационная работа Данилова посвящена изучению амилоидогенных свойств важного компонента системы обмена между ядром и цитоплазмой, нуклеопоринов.

Амилоиды представляют собой плохо растворимые агрегаты неразветвленных фибрилл белков и являются причиной многих заболеваний. Накопление амилоидов приводит к потере функциональности клеток. Автор исследует чрезвычайно важные вопросы, как способность к формированию нуклеопоринами амилоидов влияет на взаимоотношения ядро-цитоплазма, и насколько консервирована предрасположенность к формированию амилоидов у этой группы белков.

В «Обзоре литературы» подробно описаны свойства функциональных и патогенных амилоидов и также методы их идентификации. Особое внимание уделено нуклеопоринам, что облегчает понимание важности исследования. Только изредка встречаются неудачные фразы, например, «биохимические методы ...основаны на биохимических свойствах», стр.19.

В «Материалах и Методах», которые вызывающе занимают треть работы, есть мелкие неточности. В Таблице 2 не все гены написаны курсивом. В Таблице 4 смешаны обозначения фенотипов и генотипов, в столбике Маркер бактериальный детерминант обозначен и не как ген (все должны быть строчные, как в Таблице 3), и не как фенотип (должен быть обычный шрифт), а дрожжевой маркер написан как ген. В принципе, для сокращения размера раздела, все 4 технические таблицы можно было бы вынести в «Приложение».

Неточен термин «химическая трансформация» (стр. 36).

Не уточнено, какой вариант ПЭГа (молекулярная масса) применяли для дрожжевой трансформации (стр. 37).

В «Результатах» на первом этапе автор исследовал амилоидные свойства нуклеопорина человека NUP58 применяя различные подходы, от биоинформатики и биохимии до клеточной биологии. В биохимических экспериментах выяснилось, что, что белок образует устойчивые к SDS агрегаты, которые стабилизируются дисульфидными связями. Приведенные данные вполне убедительны, у нас есть только мелкие замечания и вопросы. На рисунке 5 есть непонятное слово – «скор». Переводчик Гуггл определяет это слово как резвый, быстрый. Уж лучше было бы оставить английское «score». На стр. 52-53 не совсем ясно объяснено, как автор пришел к заключению, что «консервативность амилоидных свойств была выше, чем консервативность белковой последовательности. Шкала цвета от нуля до 1 не прокомментирована автором.

В начале раздела 3.1.1. автор тяготеет к методологии, описывая, как проводили эксперимент, в мелочах повторяя текст Материалов и Методов (стр. 48), впрочем, не представляя части данных. Некоторым читателям было бы интересно увидеть, как выглядят на геле лизаты до и после индукции (стр. 53). На Рис. 7 мы можем рассмотреть, как выглядит лизат после индукции, но дорожка перегружена и не совсем понятно, как где именно искомая полоска белка. И, наверное, если уж повторять описание эксперимента, было бы более уместно напомнить, как проводили индукцию, чем рассказывать о селекции на ампициллине. Еще более важным было бы рассказать, какие фракции отобраны для дальнейшей работы после сравнительно грубой очистки одним шагом аффинной хроматографии. Начальный анализ агрегации белка не совсем понятен – сначала авторы не видят агрегатов при pH 7.0 (стр. 54), а потом демонстрируют что они образуются в довольно широком диапазоне pH, включая 7.0 (Рис. 8). Агрегаты изучены с помощью микроскопии и названы «небольшими», стр.56. Нам бы помогло понять, что это

означает, если бы на Рис. 10 были представлены фото контрольных «больших» или «маленьких» агрегатов. Например, подобные контроли представлены на рис. 14. Следующим этапом работы был анализ амилоидных свойств NUP58 *in vivo* в модельных системах. Белок, и, особенно его N-терминальный фрагмент, дали позитивный результат (образование фибрилл) в бактериальной системе C-DAG и в дрожжевой системе. В этом разделе несколько непонятным было подробное описание важности использования штаммов с фактором [*PIN*<sup>+</sup>], хотя флуоресцентные фокусы образовывались без его участия. Автор исследовал, какая часть белка NUP58 придает амилоидные свойства. Эксперименты с бактериями в целом соответствовали биоинформатическим предсказаниям, а вот дрожжевая система выдала другой результат, фокусы образовывали и C-терминальные фрагменты, негативные у бактерий; по-видимому, в дрожжах белок при экспрессии склонен к агрегации. Общее замечание к экспериментам по микроскопии – приведены фотографии отдельных клеток или групп клеток. Насколько это отражает свойства штамма, неясно. Для того, что убедить читателя, подсчитывают количество клеток с определенной морфологией, как это и сделано автором в другой части работы (Табл. 9).

В следующей, наиболее интересной части работы, автор исследует, является ли склонность белков семейства NUP к образованию амилоидов эволюционно консервативной. Выяснилось, что tgNup58<sup>60-320</sup>, dmNup98<sup>250-500</sup> и spNup98<sup>250-500</sup> могут формировать амилоидные агрегаты в модельных системах. В некоторых случаях, с дрожжевыми нуклеопоринами, статус [*PIN*<sup>+</sup>] оказывал влияние на формирование агрегатов. Прион дрожжей влиял на ядерно-цитоплазматический транспорт при экспрессии ряда ортологов нуклеопоринов.

Интересное «Обсуждение» объясняет авторское видение полученных результатов и место работы в понимании амилоидогенеза и, в случае нуклеопоринов, на ядерно-цитоплазматические отношения. Это помогает значению исследования.

Выводы полностью соответствуют полученным важным результатам.

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 *Saccharomyces cerevisiae*» соответствует специальности 1.5.7.Генетика. Диссертация является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития генетики амилоидозов, и изложены новые научно обоснованные технические, технологические или иные решения и разработки, имеющие существенное значение для развития страны.

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

Диссертация соответствует критериям, которым должны отвечать диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических 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, профессор

Павлов Юрий Иванович

Ученая степень, ученое звание, должность

подпись

Ф.И.О.

Дата: 27 декабря 2024