

## ОТЗЫВ

председателя диссертационного совета на диссертацию Данилова Лаврентия Глебовича  
«Изучение амилоидных свойств белков нуклеопоринов и влияния их агрегации на импорт  
макромолекул в ядро в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*»

научная специальность 1.5.7. Генетика

### **Актуальность темы диссертационной работы**

Диссертация Данилова Лаврентия Глебовича посвящена изучению амилоидных свойств нуклеопоринов разного происхождения и влияния агрегации этих белков на ядерно-цитоплазматический транспорт макромолекул у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Известно, что амилоиды могут образовывать упорядоченные агрегаты, организованные в неразветвленные фибриллы, обогащенные  $\beta$ -слоями. Такие агрегаты образуются при различных амилоидозах, таких как болезни Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона.

В настоящее время проводится анализ протеомов с целью поиска и анализа новых амилоидогенных белков, которые могут сами образовывать агрегаты или входить в состав уже существующих агрегатов. Такие белки были обнаружены среди нуклеопоринов, белков, формирующих ядерную пору. Амилоидные свойства были обнаружены и у нуклеопоринов дрожжей. В то же время остается неизвестным влияет ли агрегация нуклеопоринов на транспорт молекул в ядро.

Принимая во внимание, что образование амилоидов является причиной многих неизлечимых заболеваний человека, выяснение последствий влияния агрегатов на такие важнейшие процессы в клетке, как, в частности, транскрипция, усиливает интерес к их изучению. В связи с вышесказанным диссертационная работа Данилова Лаврентия Глебовича является **весьма актуальной и своевременной**.

Для достижения цели диссертации и решения поставленных задач, автор использует интегральный подход, сочетающий методы генетики дрожжей, генетической инженерии, биохимии, разные виды микроскопии, биоинформатические методы. Использование этих методов позволило получить информацию, отличающуюся новизной и представляющую практический интерес.

Целью работы являлась оценка консервативности амилоидных свойств нуклеопоринов с FG-повторами и влияния их агрегации на ядерно-цитоплазматический транспорт.

Нуклеопорин человека NUP58 был выявлен как потенциальный амилоид и в работе проанализированы его свойства. Был проведен поиск участка белка, ответственного за агрегацию и оценка консервативности амилоидных свойств ортологов дрожжевых нуклеопоринов Nsp1 и Nup145 в системе C-DAG и в клетках дрожжей. Изучено влияние агрегации этих белков на ядерно-цитоплазматический транспорт.

### **Научная и практическая значимость работы**

Полученные Даниловым Л.Г. результаты, бесспорно, обладают **научной новизной**. Автором был проведен биоинформатический скрининг нуклеопоринов для оценки консервативности амилоидогенных свойств этих белков. Удалось показать, что нуклеопорины из различных организмов демонстрируют амилоидные свойства в

дрожжевой системе и системе C-DAG. Кроме того, был выявлен участок, ответственный за агрегацию белка NUP58 человека. При использовании дрожжевой системы было показано, что фрагменты нуклеопоринов spNup98250-500, Nup5860-320 *Taeniopygia guttata* и Nup98250-500 *Drosophila melanogaster* приводят к снижению импорта макромолекул в ядро.

### **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 отечественных и международных научных конференциях и опубликованы в отечественном и двух международных научных журналах.

### **Структура и содержание диссертации**

Диссертационная работа Данилова Л.Г. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, выводов и списка литературы, содержащего 165 ссылок. Работа изложена на 108 страницах, содержит 31 рисунок и 11 таблиц.

**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.** Первая часть обзора посвящена истории открытия и изучения амилоидов, их распространенности, свойствам функциональных и патологических амилоидов. Особое внимание уделено методам идентификации амилоидов. Рассмотрены классические и современные методы идентификации и выделения амилоидов, такие как TAPI (протокол очистки и идентификации амилоидов) и PSIA (протеомный анализ и идентификация амилоидов), а также современный удобный метод C-DAG, позволяющий выделять и анализировать амилоиды с использованием колоний и клеток бактерий. Особое внимание уделено системе тестирования амилоидов в дрожжах.

В последнем разделе обзора литературы рассмотрена современная литература, посвященная нуклеопоринам. Известно, что нарушение регуляции ядерного транспорта может быть связано с заболеваниями человека, такими как рак, нейродегенеративные заболевания и вирусные инфекции. В случае развития нейродегенеративных процессов происходит повреждение комплекса ядерной поры накапливающимися белковыми агрегатами, что может приводить к гибели клетки. Тем не менее, остается не ясной функциональная роль нарушения ядерно-цитоплазматического транспорта в возникновении и прогрессировании нейродегенеративных заболеваний. Обзор литературы достаточно полно отражает состояние исследований в рамках темы диссертационной работы и хорошо иллюстрирован.

В главе «**Материалы и методы**» представлены использованные в работе методы генетики и генетической инженерии, биохимии, флуоресцентной, поляризационной и электронной микроскопии, приведены сведения о средах и условиях культивирования штаммов дрожжей, бактерий, клеток дрожжей. Используются статистические и биоинформатические методы. Все использованные методы адекватны поставленным задачам и свидетельствуют о хорошей методической подготовке автора.

В главе «**Результаты**», которая состоит из 4-х основных разделов, представлены экспериментальные данные, позволившие автору решить поставленные задачи, получить новые интересные результаты, касающиеся амилоидных свойств белка нуклеопорина NUP58 человека и механизмах ядерно-цитоплазматического транспорта.

На первом этапе с помощью биоинформатических методов был выявлен белок NUP58 человека, изучены его свойства *in vitro* и в модельных системах. На следующих этапах был идентифицирован участок белка, который обеспечивал формирование амилоида. Была проведена оценка способности к агрегации фрагмента белка NUP58 в двух системах: бактериальной и дрожжевой.

Для того, чтобы оценить степень консервативности амилоидных свойств белка NUP58 была проведена биоинформатическая оценка амилоидных свойств белков в различных таксономических группах в программе ArchCandy с наложением дополнительного фильтра на неструктурированные участки белков. Таким образом, при анализе большого объема материала были обнаружены белки Nup49 и Nup57, а также Nsp1 и Nup159. Это белки, которые располагаются непосредственно в канале ядерной поры и напрямую участвуют в образовании селективного барьера. Таким образом, можно предположить, что агрегация этих белков может иметь важное значение, для транспорта молекул.

Для изучения влияния агрегации фрагментов нуклеопоринов на ядерно-цитоплазматический транспорт были получены специализированные конструкции на основе вектора pAG415GPD-ccdB-Cerulean. В него с помощью рекомбинационного клонирования были перенесены кодирующие последовательности фрагментов нуклеопоринов различных видов - ортологов дрожжевых нуклеопоринов Nsp и Nup145, а также человеческого нуклеопорина NUP58. Сравнение цитоплазматического транспорта проводили в штаммах в [PIN+] и [pin-]. Значимое снижение ядерно-цитоплазматического транспорта по сравнению с контролем (ccdB) было получено только для фрагмента белка нуклеопорина – spNup98<sub>250-500</sub>. Полученные результаты позволяют автору высказать предположение, что наличие приона [PIN+] может влиять на процессы ядерно-цитоплазматического транспорта. В сочетании с некоторыми фрагментами нуклеопоринов этот прион снижает ядерно-цитоплазматический транспорт для всех проверенных фрагментов нуклеопоринов. Таким образом, автор считает, что ядерно-цитоплазматический транспорт в используемой системе зависит от приона [PIN+] и это взаимодействие не универсально.

В главе «**Обсуждение**» автор анализирует полученные результаты, сопоставляет их с данными других исследователей и формулирует основной вывод о том, что изменение уровня отдельных белков нуклеопоринов может влиять на процессы ядерно-цитоплазматического транспорта. Это происходит за счет изменения количества

функциональных белков, но однозначного механизма влияния агрегации нуклеопоринов на ядерно-цитоплазматический транспорт не выявлено.

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

При ознакомлении с диссертацией возник ряд вопросов и замечаний:

1. В разделе «3.1.2. Амилоидогенные свойства белка NUP58 в модельных системах» гибель клеток, содержащих плазмиды с последовательностью гена NUP58 объясняется размером белка. Существуют ли данные о гибели клеток у бактерий для белков такого же размера, которые не амилоидогенны?
2. Могут ли агрегаты белка Rnq1 индуцировать агрегацию изучаемого белка NUP58? Было показано, что для агрегации белка NUP58 наличие этого приона не обязательно, следовало бы эту особенность подчеркнуть.
3. В разделе «Влияние агрегации нуклеопоринов на ядерно-цитоплазматический транспорт» исследовали влияние агрегации фрагментов белков нуклеопоринов на ядерно-цитоплазматический транспорт. Вопрос: насколько справедливо судить о свойствах целого белка по свойствам его фрагментов?
4. В работе изучали влияние агрегации нуклеопоринов на ядерно-цитоплазматический транспорт макромолекул у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Вывод 4. *Сверхпродукция амилоидогенных фрагментов нуклеопоринов дрожжей Saccharomyces cerevisiae, а также других видов, приводит к нарушению транспорта макромолекул в ядро в клетках дрожжей в присутствии приона [PIN+]. Означает ли это, что амилоиды нуклеопоринов без [PIN+] не влияют на транспорт?*

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 роли амилоидогенеза, в ядерно-цитоплазматическом транспорте. Полученные данные представляют интерес для специалистов в области молекулярной генетики, биохимии, молекулярной медицины.

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 Данилова Лаврентия Глебовича «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».

Председатель диссертационного совета

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

(Самбук Е.В.)

