

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации (Минобрнауки России)

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИНЦ РАН)**

194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4
тел. (812) 297-18-34, факс: (812) 297-35-41.

эл. адрес: cellbio@incras.ru; <http://www.incras.ru/>
ИНН 7802030531, КПП 780201001

УФК по г. Санкт-Петербургу (Отдел № 3, ИНЦ РАН), л/с
20726Ц41010, Северо-Западное ГУ Банка России
р/с 40501810300002000001, БИК 044030001

16 " декабрь 2024 № 12316-662-457



«ТВЕРЖДАЮ»

Директор ИНЦ РАН
член корреспондент РАН

А.Н. Томилин

« 16 » декабря 2024 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

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

Диссертационная работа Данилова Лаврентия Глебовича посвящена изучению амилоидных свойств нуклеопоринов различных организмов, а также оценке влияния агрегации этих белков на импорт макромолекул в ядро у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Амилоидные фибриллы - это упорядоченные белковые агрегаты, которые представляют из себя неразветвленные волокна, обогащенные β -тяжами, уложенными в стопки параллельно друг другу. Формирование и накопление амилоидных фибрилл в различных тканях и органах связано с развитием широкого спектра неизлечимых на данный момент локальных и системных амилоидозов, в том числе, при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона. Формирование амилоидных бляшек приводит к массовой гибели клеток, стремительному ухудшению состояния пациентов, снижению качества их жизни и летальному исходу. На сегодняшний день идентифицировано несколько десятков амилоидогенных белков, приводящих к еще большему числу заболеваний (поскольку агрегация одного и того же белка может приводить к ряду патологий).

Однако было обнаружено, что амилоиды могут быть вовлечены не только в патологические процессы. Оказалось, что белки в состоянии амилоидных фибрилл могут выполнять важнейшие физиологические функции (защита клетки от внешних воздействий, поддержание клеточного иммунитета, контроль гомеостаза,

хранение гормонов, сигналинг и т.д.), что необходимо для нормального функционирования клеток и тканей. В течение двух последних десятилетий функциональные амилоиды были обнаружены у бактерий, одноклеточных эукариот, грибов, растений, насекомых и млекопитающих.

Несколько примеров белков, обладающих способностью к агрегации, известно среди дрожжевых нуклеопоринов, формирующих ядерные поры. Однако вопрос о том, как амилоидогенез этих белков влияет на транспорт молекул между ядром и цитоплазмой, до сих пор оставался открытым. Таким образом диссертационная работа Данилова Лаврентия Глебовича, направленная на решение данного вопроса, безусловно является актуальной.

Научная и практическая значимость работы

В данной работе были доказаны амилоидные свойства человеческого нуклеопорина NUP58 в различных тест-системах. С использованием делеционного анализа был проведен поиск участка белка, необходимого для агрегации. Биоинформатический анализ нуклеопоринов различных организмов позволил выявить в них консервативные амилоидогенные участки. Эти биоинформатические предсказания были проверены экспериментально. Для ряда фрагментов были доказаны амилоидогенные свойства в дрожжевой системе и системе C-DAG. Также был выявлен участок, ответственный за агрегацию белка NUP58 человека. Наконец, при использовании дрожжевой системы было показано, что фрагменты нуклеопоринов Nup98²⁵⁰⁻⁵⁰⁰ *Schizosaccharomyces pombe*, Nup58⁶⁰⁻³²⁰ *Taeniopygia guttata* и Nup98²⁵⁰⁻⁵⁰⁰ *Drosophila melanogaster* приводят к снижению импорта макромолекул в ядро. Полученные Лаврентием Глебовичем данные обладают научной новизной и позволяют существенно расширить наши представления о многообразии амилоидов и их вовлеченности в различные физиологические и патологические процессы.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Данилова Л.Г. построена по традиционному плану и состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 106 страницах, содержит 31 рисунок и 11 таблиц. Список цитируемой литературы включает 165 источников.

В главе «Введение» 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.

В главе «Обзор литературы» автором рассмотрены примеры функциональных и патологических амилоидов эукариот и прокариот и их свойства. Кроме того, в главе описаны методы идентификации амилоидов. Особое внимание уделено методу C-DAG, позволяющему выделять и анализировать амилоиды с использованием колоний и клеток бактерий, а также описаны различные варианты

выявления амилоидных свойств белков в клетках дрожжей. В финальной части «Обзора литературы» описаны функции нуклеопоринов и их амилоидогенные свойства, а также рассмотрено влияние агрегации белков на ядерно-цитоплазматический транспорт. В завершение «Обзора литературы» автор отмечает, что вопрос о взаимосвязи агрегации нуклеопоринов и нарушения ядерно-цитоплазматического транспорта остается открытым. Обзор литературы достаточно полно отражает состояние исследований в рамках темы диссертационной работы.

В главе «**Материалы и методы**» представлены использованные в работе методы генетической инженерии, биохимии, флуоресцентной, поляризационной и электронной микроскопии, приведены сведения об используемых штаммах бактерий и дрожжей, а также об условиях культивирования бактериальных и дрожжевых клеток. Приведена информация о примененных статистических и биоинформатических методах. Все использованные методы адекватны поставленным задачам. В качестве замечания только можно отметить, что в разделе 3.1.1 для подтверждения амилоидной природы агрегатов NUP58, сформированных *in vitro*, автор анализирует их морфологию (с использованием просвечивающей электронной микроскопии), устойчивость к воздействию внешних факторов (протеаз, ионных детергентов и кипячения) и их связывание с амилоид-специфическими красителями (конго красным и тиофлавином Т), но упускает важную информацию о вторичной структуре амилоидов. Хорошо было бы дополнить этот раздел данными, полученными с помощью методов рентгеновской дифракции, КД- или ИК-спектроскопии.

В главе «**Результаты**», которая состоит из 4-х основных разделов, представлены экспериментальные данные, полученные автором. Использование интегрального подхода, сочетающего методы генетической инженерии, биохимии, микроскопии, спектроскопии и биоинформатики, позволило доказать амилоидогенные свойства нуклеопоринов различных организмов, а также получить информацию о возможной роли фибриллогенеза этих белков в ядерно-цитоплазматическом транспорте. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

В главе «**Обсуждение**» приводится анализ полученных результатов и сопоставление их с данными других исследований. На основании проведенного анализа литературных данных и полученных в работе результатов автор приходит к заключению, что изменение уровня некоторых нуклеопоринов может влиять на процессы ядерно-цитоплазматического транспорта. **Выводы** диссертации соответствуют поставленным задачам, вытекают из проведенных экспериментов, четко сформулированы, аргументированы и достоверны.

Основные вопросы и замечания к диссертации

При ознакомлении с работой возникли следующие замечания, которые не носят принципиального характера:

1) Работа не лишена некоторых неточностей, опечаток, стилистических и пунктуационных ошибок. Например, «бляшки при болезни *Альцгеймер*» (стр. 11),

«экстреклаточных образований» (стр. 13), «функционирует на поверхности клетки стенки» (стр. 13), «самым токсичным является олигомеры пептида» (стр. 13), «флуорисценция» (рис. 15, ось у), SSA вместо SAA (Serum Amyloid A) (стр.18), «SDD-PAGE» вместо SDS-PAGE (стр.19) и т.д.

2) В «Обзоре литературы» автор отмечает, что «такие агрегаты образуются при различных амилоидозах, таких как болезни Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона» (стр. 5). Несмотря на то, что накопление амилоидных фибрилл при нейродегенеративных заболеваниях, действительно, является причиной дегенеративных нарушений, тем не менее согласно современной номенклатуре болезни Альцгеймера и Паркинсона не относятся к амилоидозам (Buxbaum et al., Amyloid nomenclature 2024: update, novel proteins, and recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) Nomenclature Committee, 2024, *Amyloid*, 31(4): 249-256). В связи с этим использованная диссертантом формулировка не совсем корректна.

3) Кроме того, отмечено, что «для всех амилоидов можно выделить общие свойства. К этим свойствам относятся ... образование детергент и протеазоустойчивых агрегатов» (стр. 5) и что «на сегодняшний день можно выделить ряд свойств, которые присущи всем амилоидам:...устойчивость к детергентам, таким как SDS» (стр. 9). Несмотря на то, что долгое время это представление, действительно, было широко распространено, результаты последних исследований свидетельствуют о том, что амилоидные фибриллы на основе разных белков имеют разную устойчивость к детергентам. Кроме того, на примере целого ряда протеолитических ферментов и различных амилоидов был опровергнут миф об их протеазоустойчивости. На самом деле амилоиды подвергаются деградации под действием протеолитических ферментов. Однако авторы работ отмечают, что воздействие протеолитических ферментов редко приводит к деполимеризации амилоидов на мономерные субъединицы. Вероятно, именно это хотел подчеркнуть диссертант.

4) В диссертации указано, что амилоидные фибриллы формируются за счет образования межмолекулярных водородных связей (стр. 9), что не вызывает сомнений. Но хорошо было бы упомянуть и о других взаимодействиях, чтобы у читателей не создавалось впечатление, что стабильность амилоидных фибрилл обеспечивается исключительно водородными связями.

5) Автор отмечает, что «на сегодняшний день амилоидом принято считать любой белок без ассоциированных с ним компонентов в любом клеточном компартменте и обладающий одной из следующих структур: ...» (стр. 9). Диссертант имел в виду «любой белковый агрегат»? Что все-таки автор понимает под амилоидами – мономерные белки или их агрегаты?

6) В диссертации приводятся данные о том, что «за последние 5 лет был выявлен ряд функциональных амилоидов». На самом деле, в 2021 г. вышел обзор, который называется «Two Decades of Studying Functional Amyloids in Microorganisms» (Levkovich at al., 2021, *Trends in microbiology*, 29(3): 251-265). Таким образом, история изучения функциональных амилоидов началась существенно раньше.

7) Автор отмечает, что «на сегодняшний день известно 2 пептида Аβ, состоящие из 40 и 42 аминокислотных остатков, соответственно» (стр.17). На самом деле известно большое количество изоформ Аβ длиной от 30 до 51 аминокислотных остатков, формирующихся в результате процессинга APP. Вероятно, автор имел в виду, что именно обозначенные пептиды являются наиболее распространенными изоформами Аβ.

8) При описании результатов работы автор отмечает, что флуоресцентные фокусы свечения белка NUP58, сшитого с GFP, визуализируемые с использованием флуоресцентной микроскопии, служат доказательством амилоидогенных свойств NUP58 (стр. 64). Однако скорее это служит доказательством способности белка к агрегации. Кроме того, недавние исследования показывают способность GFPs самостоятельно агрегировать и формировать амилоидные фибриллы. В связи с этим к результатам, получаемым с применением белков слияния с GFP нужно подходить с осторожностью.

9) Автор также отмечает, что «полученные фибриллы этого белка взаимодействовали с амилоид-специфическими красителями (Тиофлавин Т и Конго красный) и демонстрировали характерные свойства: увеличение флуоресценции (рис. 15)...» (стр. 84). На самом деле, увеличение интенсивности флуоресценции демонстрируют не фибриллы, а тиофлавин Т, связанный с ними.

10) При обсуждении полученных результатов диссертант отмечает, что «не во всех случаях используемый нами критерий для предсказания амилоидных свойств сработал» (стр. 77). Дело в том, что способность белка формировать амилоиды определяется не только наличием определенных амилоидогенных последовательностей, но и их доступностью (экспонированием в растворитель). Если эти амилоидогенные фрагменты (например, способные формировать бета-арки) экранированы от взаимодействий, агрегации происходить не будет. Таким образом, однозначных заключений о том, что критерий не сработал, из проведенных экспериментов сделать нельзя. Чтобы делать такие выводы, нужно подбирать условия, в которых происходит частичная денатурация белков и анализировать, являются ли формирующиеся при этом агрегаты амилоидными фибриллами.

Хотелось бы подчеркнуть, что сделанные замечания не влияют на общее положительное впечатление от представленной диссертационной работы и не снижают ее научную значимость.

При ознакомлении с работой также возник ряд уточняющих, методологических, а также дискуссионных вопросов:

1) На Рисунке 7 (стр. 54) автор приводит результаты анализа фракций после аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA агарозы и градиента концентрации имидазола. Из описания процедуры очистки непонятно, какие конкретно фракции из представленных были собраны. В разделе «Материалы и методы» указано лишь то, что «отбирали фракции, содержащие максимальное количество целевого белка». Можно предположить, что это фракции, загруженные на дорожки 9-23. Однако, очевидно, что помимо целевого белка в этих фракциях присутствует большое количество примесей. Вероятно, это связано с тем, что

колонка изначально была перегружена белком. Проводилась ли дополнительная очистка отобранных проб? Оценивалась ли чистота целевого белка перед проведением фибриллогенеза? Каким образом автор может подтвердить, что анализируемые агрегаты сформированы только полноразмерным целевым белком и что амилоидные затравки сформировали не примесные белки/низкомолекулярные фрагменты целевого белка? В связи с этими вопросами интересно было бы увидеть полиакриламидные гели на рисунках 8 и 9 полностью.

2) На Рисунке 10 (стр. 56) на микрофотографии представлены короткие фрагменты фибрилл на фоне большого числа небольших агрегатов. Создается впечатление, что фибриллогенез в пробе еще не завершился. Каким образом было выбрано время 96 ч. для инкубирования белка в амилоидогенных условиях? Проводилось ли исследование кинетики фибриллогенеза (например, с помощью регистрации флуоресценции тиофлавина Т), чтобы выяснить время, необходимое для завершения этого процесса?

3) Автор отмечает, что после воздействия ВМЕ (предполагаю, что это бета-меркаптоэтанол, хотя в списке аббревиатур он обозначен по-другому) происходит разрушение некоторой фракции агрегатов в пробе (стр. 57). Не проводилась ли визуализация образца с помощью просвечивающей электронной микроскопии после воздействия ВМЕ, чтобы выяснить, какие именно агрегаты подвергаются деградации, а какие устойчивы к такому воздействию?

5) На рисунке 15 (стр. 60) показано, что добавление ВМЕ в пробу с мономерным NUP58 приводит к возрастанию интенсивности флуоресценции тиофлавина Т. С чем это может быть связано?

6) Автор отмечает, что «для tgNup58₆₀₋₃₂₀, spNup45₁₋₂₂₀, hsNup98₁₋₂₅₀, spNup98₂₀₋₅₀₀, dmNup98₂₅₀₋₅₀₀ удалось детектировать флуоресцентные скопления белков» (Стр. 76). К сожалению, микрофотографии для hsNup98₁₋₂₅₀, spNup98₂₀₋₅₀₀ на Рисунке 29 не представлены (либо в названиях панелей на Рисунке 29 допущены опечатки). При этом на основании представленных микрофотографий можно сделать заключение, что наличие флуоресцентной окраски характерно для всех исследованных образцов (в том числе, для отрицательного контроля). Почему в качестве агрегирующих выделены именно перечисленные белки? В частности, из проведенного анализа микрофотографий неочевидно, на каком основании диссертант делает заключение, что в случаях tgNup58₆₀₋₃₂₀ и spNup45₁₋₂₂₀ формируются именно аморфные агрегаты белка (Стр. 76, Табл. 8), а в случае hsNup62₁₋₁₇₅ и scNup145₁₋₁₅₂ агрегации вообще не происходит (Табл. 8).

7) На основании проведенного анализа диссертант делает заключение о том, 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» (Стр. 78). С чем это может быть связано?

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Экспериментальные данные, лежащие в основе диссертационного исследования Данилова Лаврентия Глебовича, получены с использованием

современных методов, адекватных поставленным задачам, и грамотно статистически обработаны. Достоверность полученных в работе результатов и обоснованность научных положений и выводов работы не вызывает сомнений. Основные результаты работы были представлены на 4 международных научных конференциях и опубликованы в 3 статьях в международных журналах. В 2 публикациях, которые представлены в высокорейтинговых зарубежных журналах International Journal of Molecular Sciences (Q1, IF=4.9) и Biomedicines (Q1, IF=3.9), Лаврентий Глебович является первым автором, что свидетельствует о его решающем вкладе в проведение исследований.

Заключение

Диссертационная работа Данилова Лаврентия Глебовича является научно-квалификационной работой, которая вносит вклад в представления об амилоидогенных свойствах нуклеопоринов различных организмов и о возможной роли амилоидогенеза этих белков в нарушении ядерно-цитоплазматического транспорта. Полученные данные представляют интерес для специалистов в области молекулярной генетики, биохимии, молекулярной медицины.

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».

Отзыв был заслушан и утверждён на семинаре Лаборатории структурной динамики, стабильности и фолдинга белков Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук 12 декабря 2024 года (протокол № 15).

В.н.с. Лаборатории структурной динамики,
стабильности и фолдинга белков
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института цитологии
Российской академии наук,
д.б.н.

Анна Игоревна Сулацкая

Подпись д.б.н. А.И. Сулацкой заверяю:
Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института цитологии
Российской академии наук,
к.б.н.

16.12.2024г.



Ирина Ивановна Тюряева