

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Барбитова Юрия Александровича на тему: «**Механизмы дифференциальных эффектов шаперона Sis1 на прионы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae***», представленную на соискание ученой степени кандидата наук по научной специальности 1.5.7. Генетика

Оцениваемая работа имеет сверхважное научное и практическое значение. Прионы и амилоиды являются причиной многих тяжелых заболеваний. В некоторых случаях, белковые агрегаты выполняют важные полезные жизненные функции. Система контроля качества белков с участием шаперонов модулирует эффекты прионов, Подробное изучение механизмов взаимодействия и влияния шаперонов является перспективным направлением современной биомедицины. К сожалению, детали этих явлений не до конца изучены, и данная работа является весомым вкладом в эту область исследований. Это определяет нашу в целом высокую положительную оценку данной диссертации. Мы позволим себе в основном остановиться на некоторых шероховатостях, понимание и устранение которых помогут автору в дальнейшей успешной работе над статьями и заявками на финансирование.

Название говорит от шапероне Sis1, на самом деле в работе изучали эффекты и других шаперонов.

Введение несколько смущает неопределенной заикленностью на «дифференциальных эффектах шаперонов», неясно, почему это автор ставит во главу угла во вступлении, но в целях работы это прямо не фигурирует. Хорошо бы понять, что конкретно автор подразумевает под широким термином «дифференциальное влияние».

Обзор литературы, традиционно для аспирантов кафедры генетики, занимающихся прионной тематикой, обширный и полезный, и занимает около трети всей работы. Отмечаем, что недостатком является практика копирования и минимального редактирования (перевод подписей на русский) рисунков из чужих обзоров. Это умаляет значение авторского вклада в обзор и делает затруднительным его публикацию в котируемых международных изданиях. Кроме того, иногда детали подписей неоправданно изменены, это видно даже при самоцитировании, при сопоставлении рисунка 5 диссертации и Рис 1 свежего обзора автора – часть подписи в диссертации пропало. Нам также показалось, что обзор несколько отстает от последних достижений в области, всего около 6% ссылок на сторонние работы датированы 2020 и новее. В

некоторых местах автор рассуждения автора не полностью ясны, выражены в общем виде, например, стр. 38 «...можно предположить, что наблюдаемые разнонаправленные эффекты отражают роль J-белков в определении судьбы белковых агрегатов в эукариотических клетках».

Материалы и методы – достаточно подробные и отражают высокий методический арсенал автора. У нас есть мелкие замечания. На стр. 39 штамм бактерий Zeta описан поверхностно. Читатель не узнает, в каком учреждении он был создан (не всем фамилия Творогова что-то объясняет), и чем в деталях он отличается, почему надо было его использовать. Непонятно и то, что данный штамм встретился нам в диссертации еще только один раз, в разделе трансформация, но, когда дело дошло до белков, автор о нем забыл. Было бы полезным объяснить, почему в штаммах для продукции белка делетирован именно ген *PRBI*, а не другие гены протеаз, например *PEP4*. Карты плазмид на рис.6 очень низкого разрешения, что контрастирует с другими рисунками в работе. В разделе 2.3 на стр. 44 автор не последователен – есть состав среды для бактерий, но не для дрожжей, хотя для дрожжей использованы необычные среды типа ¼ YEPD. На стр. 46 надо указать создателей Image J и PIMP. На этой же странице, раздел называется «рестрикция», что не совсем точный термин, скорее жаргон в данном контексте. На стр. 47 в разделе «Лигирование» не указана концентрации смешиваемых ДНК, только соотношение. В 2.6.4 написано, что Нанодроп использовали для оценки не только концентрации, но и чистоты ДНК, но это не совсем правильно, точную концентрацию и чистоту ДНК принято оценивать прибором Qubit или просто анализировать в агарозном геле. В 2.6.5. надо было бы указать концентрацию бромистого этидия при окрашивании. В 2.6.6 правильно ли писать об «уровнях белков»? Стр. 48 – автор пишет «...добавляли 100 мкл буфера для нанесения со стандартным составом (Sambrook et al, 1989). Это довольно неопределенно, цитируемая книга содержит 1828 страниц. 2.7.2. – при описании оптимальных условий для каждого белка необходима информация (температура, время) или ссылка на то место диссертации, где это описано.

Результаты. Первая часть, которая концептуально самая главная в понимании значения работы, написана немного небрежно. Раздел. 3.1.1. Элегантный дизайн эксперимента, отличные фотографии клеток на Рис. 7Б. К сожалению, в этом разделе фатально не хватает детального экскурсоводческого рассказа об экспериментальных данных: объяснений, что мы видим на разных средах, где количество клеток, где супрессия, что свидетельствует о заявленных фенотипах, что означает разное (или зачастую почти одинаковое) количество колоний на кружочках разведений? Конечно, это нужно в том

случае если диссертация предназначена для широкого круга специалистов, а не для узкой группы исследователей, которые работают с данными штаммами. Насколько воспроизводимы полуколичественные тесты, представленные на Рис. 7 А и Г? Как автор увидел, что эффект сверхэкспрессии NLS-Sis1 усилен при повышенной температуре (на средней панели для штамма OT56 на среде без лейцина и аденина мы видим только фото при 34 градусах). Почему важно то, что прионный фенотип был сильнее выражен при повышенной температуре? Как определяли «репрезентативные клоны»? Еще одной странностью является нарезка фото с разных чашек (часто это контроль), и в одном случае (OT56) в качестве контроля представлен «бездрожжный» край чашки Петри. Тест этот очень простой и такое его представление вызывает сомнения относительно многих повторностей этих экспериментов. Есть вопросы и к рис. 7В. Почему панель с тотальным белком в два раза короче, чем сам Вестерн? Кроме того, лучшим контролем для Вестерна является на окраска Кумасси, а детекция стандартного ролевого белка. Как соотношения нетагированного и тагированного белка соотносятся с утверждением, что последний был сверхэкспрессирован? Мы читаем на стр. 56: «сверхэкспрессия NLS-Sis1 (*т.е. по обозначениям, белка*) приводила к усилению [PSI+] и изгнанию [URE3]. Однако на стр. 58 мы видим что «...количество белка Sis1-EGFP и NLS-Sis1-EGFP не отличалось, Рис. 9Г (*тут опечатка, автор должен ссылаться на рис 7В*), что свидетельствует о том, что эффекты химерной конструкции NLS-SIS1 не связаны с увеличенной продукцией белка». Далее, автор пишет, что «... эффект NLS-Sis1 может быть маскирован высокой токсичностью данного варианта белка при его сверхпродукции», оставляя читателя в недоумении, была ли эта сверхпродукция или не была? Осталось также неясным почему сверхэкспрессировали *-EGFP, а белки на геле отмеченные стрелками уже называются *.GFP. В заключении данной секции автор пишет, что «...релокализация Sis1 в ядро за счет сверхпродукции NLS-Sis1 приводит к разнонаправленным эффектам на различные прионы дрожжей, а сила этих эффектов на прионы носит штамм специфичный характер». Этот вывод не представляется полностью убедительным, так как анализ (*отсутствия сверх?*) продукции и релокализации в штаммах с плазмидами содержащими разные формы выполнен только для одного-двух штаммов.

Раздел 3.1.2. посвящен изучению размера и вида агрегатов [PSI+] у трансформантов с разными формами *SIS1*. Из описания и Рис 8А и Б понять, есть ли изменения, нелегко, но автор облегчает нашу задачу, написав, что никаких изменений нет. Поскольку количественного анализа не проведено, нам остается в это верить. В следующем разделе выяснилось, что мономерная форма Sis1 с делецией димеризационного домена, возможно, имеет сниженную способностью к поддержанию прионов дрожжей. Опять отмечен

эффект повышенной температуры. Автор отметил, что различия в фенотипах [PSI+] в штаммах *Sis1* и *sis1ΔDD* не связаны с различным уровнем продукции белка, но это не очевидно из представленной картинки (Рис.9В).

Во второй части результатов автор выясняет механизмы влияния *Sis1* с помощью тщательно продуманных биохимических подходов. В разделе 3.2.1 полезным является схема анализа на Рис. 10, но автор забыл в подписи отметить, что это адаптированный Рис.1 из собственной статьи в *FEMS Yeast Research*, 2020. Получены и детально охарактеризованы фибриллы прионов *Sup35NM* и *Rnq1* (Рис. 11А-Г) и препараты шаперонов (11Д). При этом частично теряется связь с первым разделом работы, где изучали другой прион, *Ure3*. Описание результатов определения активности шаперонов отличается на рис 11Д и в тексте; на рисунке мы видим подпись «эффекты *Ssa1* и *Sis1*», а текст на стр.66 несколько неточно объясняет, что «...очищенный *Hsp70-Ssa1* способствует восстановлению люминесценции денатурированной люциферазы, при этом его (кого? может быть ее?) активность значительно возрастает при добавлении *Hsp40-Sis1*». Чем обосновано смешивание номенклатуры, в которой белок называют или *Hsp40*, или *Sis1*, или *Hsp40-Sis1*? В разделе 3.2.2. показано, что *Sis1* взаимодействует с фибриллами *Sup35NM*, но не *Rnq1*, но описание этих

экспериментов недостаточно ясное и, следуя своей логике, автор пишет, что смешивали фибриллы с *Ssa1* или *Sis1*, стр. 66, а увидели распределение *Hsp40*, рис.12А). Заметим, что в современной литературе высокого уровня принято публиковать рисунки таким образом, чтобы они были понятны без сопровождающего текста и тщательного изучения раздела Материалы и

Методы, мы приводим справа пример из статьи в *Molecular Cell*, 2017 65, 108-116.

Соответственно, мы считаем, что в представлении результатов работы у автора есть значимая возможность для роста. Вывод о том, что присутствие *Sis1* в протеомных экспериментах во фракции, устойчивой к детергентам, не объясняется силой его взаимодействия с фибриллами требует более развернутого объяснения. Следующий подраздел суммирует результаты большой работы по доказательству отсутствия влияния аминокислотных замен и делеций в *Sup35NM* на взаимодействие с *Sis1* – считать ли это отрицательным результатом?

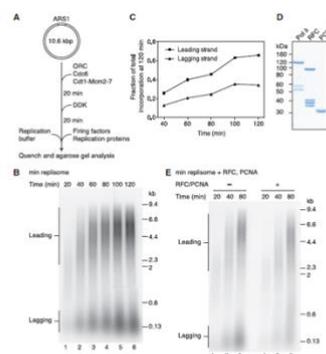


Figure 1. Replication Reactions on Soluble Plasmid Templates
 (A) Reaction scheme for soluble replication reactions is shown. Flg factors: DMC1, Csk, Csk-Munc17, DDK, Pol α , RPA, CMA.
 (B) Time course of a reaction performed as in (A) is shown.
 (C) Quantification of leading- and lagging-strand products in (B) is shown.
 (D) Coomassie-stained SDS-PAGE of proteins involved in lagging-strand replication is shown.
 (E) Replication performed as in (B) is shown.
 In this and all subsequent figures, the protein constituents of the reactions are listed above each figure. Min replicase encompasses the minimum set of proteins required for origin firing together with Cdk4 and Topo II (see A for details).

Третий обширный раздел Результатов описывает изучение связывания Hsp40 и взаимодействия с фибриллами других шаперонов с использованием сравнительно однообразных подходов, примененный в предыдущем разделе. Оказалось, что прямой взаимосвязи по линии Hsp40-Hsp70 и - Hsp104 не наблюдается и некоторые вопросы требуют дальнейшего исследования.

Обсуждение – лучший раздел работы, помогающий понять и высоко оценить проделанную автором работу в целом. Отметим рис. 20, как простой и ясный читателю. В тоже время, нам не кажется, что причина штамм-специфичности наблюдаемых эффектов шаперонов затронута и исследована. К сожалению, обсуждая причины расхождения результатов работы с литературой, автор не предпринял попытки поставить или хотя бы предложить строгие эксперименты, которые помогли бы узнать истину. Не совсем раскрыта роль температуры в наблюдаемых эффектах.

Выводы нам показались чисто техническими и узкоспециальными, они не позволяют быстро оценить глобальное значение полученных результатов, но, несомненно, отражают большой объем проделанной работы.

Заключение рецензента: Диссертация Барбитова Юрия Александровича на тему: «Механизмы дифференциальных эффектов шаперона Sis1 на прионы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в целом соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Барбитов Юрий Александрович Ф.И.О. заслуживает присуждения ученой степени кандидата наук по научной специальности 1.5.7. Генетика. Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не установлены.

Член диссертационного совета

д.б.н., профессор, зав. лаборатории генетической нестабильности института рака UNMC



Павлов Юрий Иванович

подпись

Ф.И.О.

Дата 19 января 2023