

## ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Трубициной Нины Павловны на тему «Изучение механизмов влияния нонсенс-мутаций в гене *SUP35* на свойства приона [*PSI+*] у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7.- Генетика

### **Актуальность темы диссертационной работы**

Диссертация Трубициной Нины Павловны является логическим продолжением многолетних исследований генетического контроля терминации трансляции у дрожжей, проводимых на кафедре генетики и биотехнологии СПбГУ. Настоящая работа посвящена изучению проявления мутаций в гене *SUP35*, кодирующем eRF3 - один из факторов терминации трансляции, а также влияния нонсенс-мутаций в этом гене на жизнеспособность клеток дрожжей, содержащих прионную форму eRF3.

Несмотря на многочисленные исследования процесса трансляции у дрожжей, остаются не до конца выясненными молекулярные механизмы терминации этого процесса и его регуляция. Появление сходного фенотипа у клеток дрожжей с мутациями в структурных генах факторов терминации трансляции и у клеток с прионной формой eRF3, позволило предположить, что прион [*PSI+*] может выступать как определенный регулятор, обеспечивающий неоднозначность терминации трансляции. В связи с вышесказанным диссертационная работа Трубициной Нины Павловны является весьма актуальной и своевременной.

Для достижения цели диссертации и решения поставленных задач автор использует интегральный подход, сочетающий методы генетической инженерии, разные варианты электрофоретического разделения ДНК и белков, флуоресцентной микроскопии, иммунохимического анализа. Использование этих методов позволило получить информацию, отличающуюся новизной и представляющую практический интерес. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

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

Полученные Трубициной Н.П. результаты, бесспорно, обладают научной новизной. Автором впервые показано, что нонсенс-мутации в гене *SUP35* могут способствовать появлению более стабильного и функционально активного белка Sup35, что сопровождается повышением жизнеспособности клеток *S. cerevisiae*. Впервые обнаружено, что в отсутствие гена *SUP35* дикого типа совместимость мутантных аллелей *sup35-n* и приона [*PSI+*] зависит от способа их доставки в клетку дрожжей. Показано также, что изученные аллели *sup35-n* способны приводить к изменению варианта приона [*PSI+*].

Результаты диссертации углубляют представления о механизмах работы аппарата трансляции и его регуляции в клетках дрожжей. Полученные данные могут быть использованы в курсах лекций, посвященных генетике дрожжей, механизмам и регуляции процесса трансляции, биологической роли прионов.

### **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 6 международных научных конференциях и опубликованы в 3 рецензируемых научных изданиях.

### **Структура и содержание диссертации**

Диссертационная работа Трубициной Н.П. 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 116 страницах, иллюстрирована 25 рисунками и 5 таблицами. Список цитируемой литературы включает 245 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 трех глав и заключения. Первая глава содержит краткие сведения о процессе трансляции у эукариот.

Во второй главе представлены данные о терминации трансляции у эукариот и основных белках, принимающих участие в этом процессе.

Последняя глава Обзора посвящена эффективности трансляции, влиянию миссенс и нонсенс мутаций гене *SUP35*, а также приона [*PSI+*] на этот процесс и на жизнеспособность дрожжей в присутствии [*PSI+*].

В Заключении автор кратко суммирует результаты ранее проводимых исследований терминации трансляции у дрожжей, проявления мутаций в генах *SUP35*, *SUP45* и приона [*PSI+*] и содержит обоснование настоящей работы. 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, о структуре использованных плазмид, Все использованные методы адекватны поставленным задачам и свидетельствуют о хорошей методической подготовке автора.

В главе «**Результаты**», которая состоит из 3 разделов, представлены экспериментальные данные, позволившие автору решить поставленные задачи, получить новые интересные результаты.

В первом разделе приведены результаты изучения влияния нонсенс-мутаций в гене *SUP35* на жизнеспособность клеток и дана характеристика укороченных вариантов Sup35, синтезируемых нонсенс-мутантами *sup35-n*. Полученные данные позволили автору высказать предположение, что полноразмерный белок Sup35, который синтезируется при прочитывании преждевременного нонсенс-кодона, как значащего, может работать более эффективно, чем белок дикого типа.

В следующем разделе представлены данные о влиянии нонсенс-мутаций в гене *SUP35* на поддержание приона [*PSI+*]. Для комбинирования мутаций *sup35-n* и приона [*PSI+*] в гаплоидных и диплоидных штаммах Трубицина Н.П. использовала метод потери/замещения плазмиды с интересующим вариантом гена *SUP35*. Для получения диплоидных штаммов нужного генотипа также использовали скрещивание изогенных гаплоидных штаммов [*PSI+*] [*SUP35*] и [*psi-*] [*sup35-n*], после чего элиминировали плазмиду с геном *SUP35* дикого типа.

Полученные результаты продемонстрировали отсутствие синтетической летальности мутаций *sup35-n* и приона [*PSI+*] в присутствии аллели *SUP35* дикого типа. В этих условиях мутации *sup35-n* не влияли на свойства приона [*PSI+*] и размер агрегатов в клетках дрожжей. В то же время в отсутствие аллели *SUP35* дикого типа сочетание мутаций *sup35-21*, *sup35-74* и *sup35-218* и приона [*PSI+*] приводило к гибели гаплоидных штаммов. Интересно, что штамм дрожжей *sup35-240* оказался жизнеспособен, и причиной этого явилась потеря приона [*PSI+*].

Заключительный раздел этой главы посвящен изучению влияния мутации *sup35-240*, в результате которой синтезируется самый короткий из изученных вариантов белка Sup35 на поддержание приона [*PSI+*] в клетке. Полученные результаты свидетельствуют о том, что укороченный белок Sup35-240 включается в агрегаты приона [*PSI+*], а повышенное содержание этого белка в клетке приводит к дестабилизации приона [*PSI+*].

**В «Обсуждении»** автор анализирует полученные результаты, сопоставляет их с данными других исследователей, обсуждает роль отдельных нонсенс-мутаций в гене *SUP35* на частоту образования и наследования приона, совместимость комбинации мутаций *sup35-n* с прионом [*PSI+*] в гаплоидных и диплоидных штаммах *S. cerevisiae*, влияние нонсенс-мутаций на свойства приона [*PSI+*]. На основании полученных результатов автор высказывает предположение, что включение белка Sup35-240 в прионные агрегаты, приводит к дестабилизации приона или к образованию ненаследственных агрегатов Sup35, и делает вывод о том, что мутация *sup35-240* предотвращает распространение [*PSI+*] и может рассматриваться как новая мутация *PNM*.

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

При ознакомлении с диссертацией возник ряд вопросов и замечаний:

- 1 Автор отмечает, что «Количество белка Sup45 у клеток с мутациями *sup35* не отличалось от дикого типа (Рисунок 10В)». Известно ли что-нибудь о влиянии вариантов белка Sup35 на эффективность взаимодействия с белком Sup45?
- 2 На электрофореграммах, приведенных на рисунке 12А, не хватает дорожки с маркерами молекулярной массы.
- 3 На с. 49 сказано, что в клетках [*sup35-240*] по сравнению с остальными мутантами [*sup35-n*] было наименьшее количество полноразмерного Sup35. Есть ли какие-нибудь данные о том, что происходит в клетке при нарушении эквимоллярных соотношений белков Sup35 и Sup45?
- 4 Рисунок 13В: автор объясняет появление дополнительной полосы после иммуноблотта неспецифическим взаимодействием антител к Sup45 с другими

белками. Означает ли это, что использовали поликлональные антитела к Sup45? Это следовало указать в разделе Материалы и методы.

- 5 Автор полагает, что повышение жизнеспособности диплоидных штаммов [*PSI+*] [*sup35-n*], полученных от скрещивания гаплоидных мутантов [*psi-*] [*sup35-n*] со штаммом [*PSI+*] [*SUP35*] с последующей потерей плазмиды с геном *SUP35* дикого типа, может быть обусловлено адаптацией штамма [*psi-*] [*sup35-n*] к мутациям в отсутствие приона (с.64). В связи с этим вопрос: есть ли какие-нибудь данные о протеоме использованных штаммов?
- 6 Автор высказывает предположение о том, что одним из механизмов адаптации диплоидных штаммов [*PSI+*] [*SUP35/sup35-n*], полученных скрещиванием, в отличие от гаплоидных и диплоидных штаммов [*PSI+*] [*SUP35/sup35-n*], полученных трансформацией, к потере плазмиды с геном *SUP35* дикого типа является увеличение копийности плазмид, несущих мутантные аллели (с. 81). Но почему не происходит увеличения копийности этих же плазмид у диплоидных штаммов [*PSI+*] [*SUP35/sup35-n*], полученных трансформацией?

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

Диссертационная работа Трубициной Нины Павловны является научно-квалификационной работой, которая вносит существенный вклад в понимание механизмов терминации трансляции у дрожжей, расширяет представления о возможном влиянии нонсенс-мутаций в гене *SUP 35* на поддержание и свойства приона [*PSI+*] Полученные данные представляют интерес для специалистов в области молекулярной генетики, молекулярной медицины.

Диссертация Трубициной Нины Павловны на тему «Изучение механизмов влияния нонсенс-мутаций в гене *SUP35* на свойства приона [*PSI+*] у 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 Трубицина Нина Павловна 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 05 ноября 2024 г.