

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 специальности 1.5.7. «Генетика».

Рецензируемая диссертационная работа описывает свойства нонсенс-мутаций в жизненно-важном гене *SUP35* (аллели обозначены *sup35-n*), кодирующего фактор терминации трансляции eRF3. Интрига в проблематике состоит в том, что, в теории, этот тип мутаций должен приводить к отсутствию полноценного белка и летальному эффекту. На практике же все не так, в результате нонсенс-супрессии полноразмерный белок в ограниченном количестве синтезируется и, возможно, он даже лучше нормального eRF3.

Жизнеспособность сохраняется, и, кроме того, эти аллели являются онipotентными супрессорами. Другим, еще более важным аспектом исследования было выяснение предела совместимости изучаемых аллелей с прионом [*PSI*⁺], агрегированной формой eRF3. Выявлена удивительная зависимость от истории создания штамма. Эти тонкие грани между возможным и невозможным вызывают огромный интерес и делают работу новой и значимой. Механизмы этих тонких эффектов изучены комбинацией современных подходов: молекулярно-генетически, биохимически и цитологически. Диссертация вносит существенный вклад в понимание природы трансляции и ее контроля, а также архиважной проблемы познания механизмов возникновения и поддержания прионов,

Единственным недостатком работы в целом мы считаем неярко и довольно узкоспециальное Введение, смысл и детали которого можно понять только после прочтения всей работы. Задача 1 почти дословно повторяет цель работы (Стр. 5 и повторена на Стр.35). Глобальная важность исследования не разъяснена, автор ограничилась размытой фразой о пользе работы для понимания аппарата трансляции и для учебного процесса. Первое положение, выносимое на защиту (Стр.8) высказано неуверенно (это ощущение возникает из-за слова «может», то есть может и нет?).

Обзор литературы детально описывает все необходимое для понимания диссертационной работы и ее важности. У нас есть вопрос. Транслируется ли минорный транскрипт *SUP35*, играет ли он какую-нибудь роль в клетке (Стр.13)? Если да, как этот транскрипт может модифицировать эффекты изучаемых аллелей *SUP35*? Также хотелось бы подробнее узнать, как была построена схема отбора мутантов, которые описаны на Стр. 20-23.

Глава «Материалы и Методы» уверенно и точно описывает методологию исследования.

В главе «Результаты» три части. В первой изучены фенотипы нонсенс-мутаций и белки, которые накапливаются в клетке. Привлекательным контролем было конструирование вариантов *SUP35*, которые кодируют те же варианты белка, что могут появляться при супрессии нонсенс-кодонов. Интересным явилось и доминантное проявление мутаций *sup35-n* и полное исчезновение белков *Sup35-n* у гетерозигот. Рецензент был бы счастлив сразу же увидеть объяснение эффекта, хотя бы в виде ссылки на соответствующий раздел Обсуждения. Следующие два раздела посвящены взаимоотношениям изучаемых мутаций с прионами в штаммах [*PSI*⁺]. Выяснилось, что мутации *sup35-n* совместимы с прионом при поддержке нормальной копии *SUP35*, и агрегаты сохраняются. В гаплоидных штаммах без *SUP35* три аллели *sup35-n* оказались несовместимыми с прионом, а мутация *sup35-240* приводила к его элиминации. Аналогичное исследование у диплоидов показало, что исход зависит от метода получения штаммов. Смена плазмиды показывала несовместимость трех аллелей с прионом. Ситуация выправлялась при получении диплоидов при скрещивании и потере плазмиды с *SUP35*. Автор предполагает, что гаплоиды [*psi*⁻] [*sup35-n*] как-то адаптировались к мутациям и это свойство доминирует у диплоидов [*PSI*⁺], но несколько модифицирует свойства прионов, например приводит к пониженной инфекционности. Одна из мутаций, *sup35-240*, обладала анти-прионными свойствами, короткий белок, по-видимому, включался в агрегаты и блокировал их рост.

Раздел «Обсуждение» соответствует результатам и объясняет полученную совокупность экспериментальных данных. Рецензенту в этой части не хватало суммарного рисунка, который облегчил бы понимание результатов в целом и в краткой форме высветил авторскую трактовку наблюдаемых эффектов. Также, этот раздел украсило бы обсуждение глобального значения полученных результатов за рамками дрожжей.

Интересные и важные результаты, оригинальные подходы искупают некоторые шероховатости диссертации. Мы заметили незначительные неясности и неточности, не влияющие на общую оценку работы, но отметим их для того, чтобы автор избежал повторения в последующих работах.

Список сокращений попал в конец работы, а ведь расшифровка требовалась с первой страницы.

Стр.7. Есть ли определение «слабого нуклеотидного контекста»?

Стр 36, текст под таблицей – неточно, *ura3-52* – инсерция транспозона, *leu2-3,112* – (не 2-2,112) - двойная мутация.

Стр.39 – В описании среды 1/4 YPD авторы приводят ссылку, где фигурирует среда 1/4YEPD. Состав среды авторов остается неясным. Впрочем, на Рис.19 и 24 буква «Е» мимолетно появляется.

В целом Результаты ясно изложены и иллюстрированы, хотя в некоторых случаях представлены качественные результаты понятные только узким специалистам.

Рис. 9 частично перекрывается с Рис. 6, часть информации дублирована в Табл. 3.

Рис. 10Б. Можно ли на данном блоте увидеть фрагмент 7 кДА? Судя по маркерам, белок убежал на пределы геля.

Стр. 51. Несколько странно, что авторы изучили только тот вариант, который не детектировался Вестерном и в котором очень мало полноразмерного белка. Про остальные варианты написано, что, возможно с ними происходит то же самое.

Рис. 11Б трудно рассмотреть из-за размеров и не очень ясно объяснено, что мы видим на разных средах. Хорошо бы иметь контроли в этом эксперименте. Например, поведение штамма, где супрессия есть.

Рис 12А отличается от Рис 10А, полноразмерного белка не видно, хотя штаммы одни и те же.

Стр.53. Несколько неясна фраза «Примечательно, что в присутствии двух аллелей гена *SUP35* белки Sup35-п мы не обнаружили». Почему двух и чем это примечательно?

Рис 15 не очень ясно объяснен. Для читателей широкого профиля хорошо бы рассказать, что означает цвет штриха, отражает ли он рост (см. подпись)?

В эксперименте, отраженном на Рис 16 хорошо бы видеть контроль (вектор сам по себе) на эффективность трансформации штаммов пси минус и плюс. В панели Б не указана среда, на которой растут диплоиды.

Стр. 58. Логика первого абзаца раздела 3.2.3 неочевидна. В целом, в разделе полуколичественные результаты не вполне убеждают читателя в однозначности предложенных автором трактовок.

Рис.18. Некоторые мутанты (особенно 74) вовсе не дают колоний на среде с фтор-оротатом вне зависимости от статуса фактора пси. Автор же описывает это как «плохой рост». Насколько воспроизводим данный эффект?

Стр. 64. Предположение о возможности клеток адаптироваться к мутациям в отсутствие приона чисто гипотетическое, как его можно проверить?

Стр.67. Не совсем понятно, что за варианты приона автор предполагает в последнем предложении, тем более что разъяснению посвящена специальная часть работы, 3.2.8.

Стр.68. Последние предложения про облако прионов интересны, но не до конца разъяснены. Хотелось бы увидеть более подробное описание идеи.

Рис. 23Б. Нам не удалось понять из подписи, где на рисунке М и М*.

Стр.72. Мы немного запутались в словах «проанализировать это несоответствие».

Повторим, эти мелкие неточности не снижают ценности этой великолепной работы.

С учетом всего вышесказанного полагаю:

Содержание диссертации Трубициной Нины Павловны на тему: Изучение механизмов влияния нонсенс-мутаций в гене *SUP35* на свойства приона [*PSI*⁺] у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* соответствует специальности 1.5.7. Генетика. Диссертация является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, имеющей значение для развития соответствующей отрасли знаний, в ней изложены новые научно обоснованные 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, заведующий лабораторией

подпись



Павлов Юрий Иванович

Дата: 4 ноября 2024