

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

Изучение прионов важно не только с точки зрения поиска подходов для лечения прионных заболеваний, но и также для решения фундаментальной задачи — определения механизмов регуляции синтеза белка. Кроме того, известно, что укороченные формы амилоидогенных белков, возникающие в результате нонсенс-мутаций или альтернативного сплайсинга в редких соматических клетках, могут инициировать спонтанное локализованное образование амилоидов, которые затем могут распространяться, приводя к спорадическому амилоидному заболеванию.

Диссертация Трубициной Нины Павловны посвящена изучению молекулярных механизмов, лежащих в основе терминации трансляции и роли прионов в эукариотической клетке, в частности клетке дрожжей. Для этого в работе были изучены проявления нонсенс-мутаций в гене *SUP35*, который кодирует фактор терминации трансляции eRF3, дающий при своей агрегации прион [PSI+]. Известно, что белки Sup45 и Sup35 выполняют функцию факторов терминации трансляции eRF1 и eRF3 у *S. cerevisiae*, соответственно, и работают в комплексе. При недостатке одного из них, или при наличии мутаций в генах *SUP45* и *SUP35*, происходит снижение точности терминации трансляции, что характеризуется появлением нонсенс-супрессорного фенотипа у клеток дрожжей.

Аналогичным фенотипом обладают и клетки, содержащие прион [PSI+], что позволило предположить его участие в процессах регуляции терминации трансляции. Ранее в серии работ лаборатории было показано, что клетки с нонсенс-мутациями в гене *SUP45* в присутствии «сильного» варианта приона [PSI+] нежизнеспособны, что объясняется снижением количества белка Sup35 и отсутствием белка sup45.

В настоящее время процесс терминации трансляции изучен недостаточно, в связи с чем диссертационная работа Трубициной Нины Павловны является весьма актуальной и своевременной.

Научная и практическая значимость работы

Целью данной работы явилось изучение влияния нонсенс-мутаций в гене *SUP35* на жизнеспособность клеток [PSI+].

В данной работе показано, что наличие нонсенс-мутаций *sup35* в присутствии гена *SUP35* дикого типа и нормального гена *SUP45* обеспечивало жизнеспособность клеток с «сильным» и «слабым» вариантами приона.

Для достижения поставленной цели были поставлены следующие задачи:

1. Проверить жизнеспособность гаплоидных и диплоидных штаммов, содержащих прион [PSI+] в сочетании с мутациями *sup35*
2. Оценить влияние мутаций *sup35-n* на свойства приона [PSI+].

Для достижения цели диссертации и решения поставленных задач, автор использует интегральный подход, сочетающий методы классической генетики и генетической инженерии, биохимии и микроскопии. 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.

В представленной работе показано, что на фоне нонсенс-мутаций в гене *SUP35* могут возникать супрессорные мутации, способствующие появлению более стабильного и функционально активного белка Sup35, что может повышать жизнеспособность клеток *S. cerevisiae*. Впервые обнаружено, что совместимость мутантных аллелей *sup35-n* и приона [PSI+] в отсутствие гена *SUP35* дикого типа зависит от метода их доставки в дрожжевую клетку — трансформации или скрещивания. Кроме того, показано, что изучаемые аллели *sup35-n* способны приводить к изменению варианта приона [PSI+]. Результаты представленной диссертации углубляют понимание механизмов работы трансляционного аппарата клетки и его регуляции, они могут быть использованы в различных кафедральных курсах.

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, входящих в Перечень ВАК и приравненных к ним иностранных изданиях.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Трубициной Н.П. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, включающей материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводов, списка цитированной литературы. Работа изложена на 118 страницах, содержит 25 рисунков и 5 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 242 источника.

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. Обзор посвящен истории изучения терминации трансляции и факторам, модифицирующим ее эффективность, у дрожжей *S. cerevisiae*. Особое внимание уделено генам *SUP35* и *SUP 45*, их белкам и функциям. Подробно рассматриваются белки, с которыми взаимодействует Sup35. В генах *SUP35* и *SUP 45* изолированы нонсенс- и миссенс-мутации, изучено их расположение и оценена выживаемость. Среди выделенных ранее нонсенс-мутантов были обнаружены такие, у которых в процессе трансляции синтезировались полноразмерные копии белков. В этом разделе следовало бы обсудить механизмы и эффективность супрессии нонсенс-мутаций в гене *sup35*, которые были изучены и опубликованы ранее, это значительно облегчило бы понимание работы.

В главе «**Результаты**», которая состоит из трех крупных разделов, представлены экспериментальные данные, позволившие автору решить поставленные задачи, получить новые интересные результаты, касающиеся свойств нонсенс-мутантов в гене *SUP35* и взаимодействию с прионом [PSI+]. Первый раздел посвящен изучению влияния нонсенс-мутаций в гене *SUP35* на жизнеспособность клеток дрожжей и свойства приона [PSI+]. Для этого, полученные ранее 4 нонсенс-мутации, были введены в новый штамм путем замены копии гена *SUP35* на мутантные варианты и охарактеризован их фенотип.

На следующем этапе выясняли способны ли мутации *sup35-n* приводить к появлению более стабильного и функционально активного белка Sup35 в клетках дрожжей. В результате удалось показать, что при нонсенс-супрессии мутаций *sup35-n* может возникать более стабильный и функциональный полноразмерный белок Sup35.

На следующем этапе оценили стабильность белков, выделенных из нонсенс-мутантов Sup35-n в штаммах 7A-D832 [*SUP35 LEU2*] и [*sup35-n LEU2*] после обработки клеток циклогексимидом. Представлены результаты вестерн-блоттинга с антителами к белку Sup35 из лизатов штаммов 7A-D832, несущих плазмиду pRSU1 либо с геном *SUP35* дикого типа, либо с одной из мутантных аллелей *sup35*, после инкубации в среде YPD, содержащей 100 мкг/мл циклогексимида (CHX), в течение 0, 4 и 20 ч. Результаты представлены на рис. 12. К этому рис. будет вопрос. Появление полос большего молекулярного веса на геле достаточно трудно объяснить, почему его становится больше после 4-х часов инкубирования?

В следующем разделе продемонстрировано доминантное проявление мутаций *sup35-n*. Для этого скрестили штаммы a8-7A-D832 [*psi-*] [*sup35-n*] с изогенным штаммом 7A-D832 [*psi-*] [*SUP35*]. Полученные диплоидные клетки обладали нонсенс-супрессорным фенотипом, что подтверждает присутствие в них мутантных аллелей *sup35-n*. Оказалось, что прион [PSI+] совместим с мутациями *sup35-n* в присутствии аллеля *SUP35* дикого типа у гаплоидных и диплоидных штаммов.

Следующей задачей стало получение мутантов [PSI+], несущих только аллели *sup35-n*. Удалось показать, что комбинация приона [PSI+] с мутациями *sup35-21*, *sup35-74* или *sup35-218* приводит к летальности гаплоидных клеток, но не самого короткого 240.

Оказалось, что мутация *sup35-240* приводит к изгнанию приона [PSI+] в гаплоидных штаммах в отсутствие гена *SUP35* дикого типа.

Далее проверяли могут ли гаплоидные и диплоидные штаммы дрожжей отличаться по своей совместимости с прионом [PSI+]. Для проверки этого предположения использовали диплоидные штаммы, отличающиеся способом их получения: трансформацией диплоидных штаммов, либо скрещиваниями соответствующих гаплоидных штаммов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что проявление несовместимости мутаций *sup35-n* и приона [PSI+] зависит скорее не от пloidности используемых штаммов, как это могло показаться изначально, а от метода получения клеток [PSI+] [*SUP35/sup35-n*]. Штаммы [*psi-*] [*sup35-n*] имели возможность адаптироваться к мутациям в отсутствие приона и тем самым повысить жизнеспособность диплоидных клеток [PSI+] [*sup35-n*].

Было обнаружено, что агрегаты белка *Sup35* диплоидных штаммов [PSI+] [*sup35-n*] имеют сниженную инфекционность по сравнению с диким типом [PSI+] [*SUP35*]. Диплоидные клетки [PSI+], полученные скрещиванием, и несущие мутантную аллель *sup35-21*, *sup35-74* или *sup35-218*, способны поддерживать прион. При этом он изменяет свои свойства, что проявляется в увеличении размера агрегатов белка *Sup35* и их потере после замены плазмиды с мутацией *sup35-n* на плазмиду с геном *SUP35* дикого типа. Диплоидные клетки, содержащие мутацию *sup35-240*, теряют прион [PSI+]. Мутация *sup35-240* предотвращает поддержание приона [PSI+] в клетке за счет того, что короткий белок *Sup35-240* включается в агрегаты приона [PSI+]

Обсуждение

В главе «Обсуждение» автор анализирует полученные результаты, сопоставляет их с данными других исследователей и формулирует основной вывод о том, что нонсенс-мутации *sup35-n* способны влиять на свойства приона [PSI+].

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

При ознакомлении с диссертацией возник ряд вопросов и замечаний:

1. Ранее считалось, что нонсенс- и миссенс мутации в гене *SUP35* были рецессивными, были ли выявлены доминантные мутации в этом гене?
2. К рис. 10 возникает несколько вопросов:
 - А. Судя по росту штаммов дрожжей, самый «короткий нонсенс» растет лучше всего, то есть эффективность супрессии у него выше?
 - В. Почему предполагается, что нонсенс-мутации в гене *sup35* могут влиять на уровень белка *sup45*?
3. Вопрос к рисунку 12.А. Представлены результаты вестерн-блоттинга с антителами к белку *Sup35* из лизатов штаммов 7A-D832, несущих плазмиду *pRSU1* либо с геном *SUP35* дикого типа, либо с одной из мутантных аллелей *sup35*, после инкубации в среде YPD, содержащей 100 мкг/мл циклогексимида (CHX), в течение 0, 4 и 20 ч. Появление полос большего молекулярного веса на геле достаточно трудно объяснить, почему его становится больше после 4-х часов инкубирования?

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

Диссертация Трубициной Нины Павловны является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение научной задачи, которая вносит существенный вклад в понимание механизмов амилоидогенеза, расширяет представления о функциональных амилоидах и имеет значение для развития соответствующей отрасли знаний. 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 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», 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

(Самбук Е.В.)

подпись 

Ф.И.О.

Дата 01.11.2024