

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

"09".04.2024 № 12316-806-147

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИНЦ РАН
член-корреспондент РАН


«09» апреля 2024 г.

А.И. Томилин

**ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ
о диссертации Андрейчук Юлии Вячеславовны
на тему «Исследование влияния амилоидизации белков на стабильность
генетического материала у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*»,
представленной на соискание учёной степени кандидата биологических
наук по специальности 1.5.7 – генетика**

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа Андрейчук Ю. В. посвящена изучению взаимосвязи амилоидизации белков и возникновения генетических нарушений у дрожжей на примере модельного организма *Saccharomyces cerevisiae*. Ранее было установлено, что дестабилизация генома (мутации, хромосомные перестройки и изменение числа хромосом) приводит к развитию различных онкологических заболеваний. При этом формирование и накопление упорядоченных белковых агрегатов, амилоидных фибрилл, в различных тканях и органах связано с развитием нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, диабета, а также широкого спектра локальных и системных амилоидозов. К настоящему моменту описан ряд примеров, указывающих на существование взаимосвязи между амилоидогенезом и мутагенезом. Проведение дальнейших исследований в данной области и установление механизмов, лежащих в основе выявленной взаимосвязи, важно как для фундаментальной науки, так и для медицины. Таким образом, актуальность темы диссертационной работы не вызывает сомнений.

Научная новизна исследования, полученных результатов и выводов

В данной работе впервые проанализирована причинно-следственная связь между возникновением приона [PSI^+] (агрегированной формы фактора терминации трансляции Sup35(eRF3)) и генетических изменений (генных, хромосомных и геномных мутаций) у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для этого было исследовано, каким образом прионы влияют на частоту различных генетических изменений и как нарушение работы систем, участвующих в поддержании стабильности генома, влияет на частоту возникновения приона. Одним из основных подходов к проведению этих исследований стала уникальная методика (альфа-тест), разработанная на Кафедре генетики и биотехнологии СПбГУ, которая представляет собой тест для генетической токсикологии, позволяющий выявлять широкий спектр наследуемых и предмутационных изменений генетического материала. С применением этого подхода и других современных генетических и молекулярно-биологических методик автором впервые было показано, что частота совместного появления в клетке дрожжей приона [PSI^+] и генетических изменений более чем в 50 раз превосходит ожидаемую частоту одновременного независимого возникновения этих событий, что свидетельствует об их взаимосвязи. Автор выдвигает гипотезу о том, что переход белка Sup35 из растворимой формы в агрегированную и возникновение мутаций обусловлены одним и тем же фактором, которым могут являться активные формы кислорода, повреждающие молекулы белка и ДНК.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов, сформулированных в диссертации

Экспериментальные данные, лежащие в основе диссертационного исследования Андрейчук Ю.В., 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 2 международных и 3 всероссийских научных конференциях и опубликованы в 5 статьях, одна из которых представлена в высокорейтинговом зарубежном журнале *International Journal of Molecular Sciences* (Q1). В 3 из 5 публикаций Юлия Вячеславовна является первым автором, что свидетельствует о ее решающем вкладе в проведение исследований.

Научно-практическая ценность диссертации

Результаты диссертационной работы имеют значение как с фундаментальной точки зрения для расширения представлений о взаимосвязи амилоидогенеза и мутагенеза, так и для прикладных исследований в области медицины. Полученные результаты являются шагом к более глубокому пониманию механизмов

наследственной и модификационной изменчивости, а также причин развития целого ряда социально-значимых заболеваний.

Общая характеристика работы, ее структура и содержание

Диссертационная работа Андрейчук Ю. В. построена по традиционному плану и состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 113 страницах, проиллюстрирована 15 рисунками и 17 таблицами. Список цитируемой литературы включает 261 источник.

Во «Введении» обоснована актуальность проведения исследования, сформулированы цель и задачи работы, приведена информация о степени разработанности темы исследования, отражены научная новизна и научно-практическая значимость работы, приведены цель, задачи работы и 5 основных положений, выносимых автором на защиту, представлена информация о личном вкладе автора в проведенную работу и об апробации ее результатов. Есть небольшое замечание к формулировке цели работы («изучение взаимодействия амилоидогенеза белка Sup35 и механизмов, участвующих в поддержании стабильности генетического материала у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*»). «Амилоидогенез» (как процесс) и «механизмы, участвующие в поддержания стабильности» сложно рассматривать в качестве объектов, воздействующих друг на друга. Может быть, использование слова «взаимосвязь» вместо «взаимодействие» было бы уместнее? Аналогичное замечание относится к тексту на стр. 41 («...механизмов взаимодействия амилоидогенеза и процессов дестабилизации генома»). Также можно было бы скорректировать первое положение, выносимое на защиту («Частота одновременного возникновения приона [*PSI*+] и генетических изменений в клетке дрожжей *S. cerevisiae* превышает теоретически ожидаемую частоту в случае их независимого появления»), поскольку из него складывается ощущение, что фраза «их независимого появления» относится к дрожжам *S. cerevisiae*.

В «Обзоре литературы» автор описывает процессы передачи наследственной информации в живых организмах, механизмы формирования амилоидных фибрилл, приводит примеры патологических и функциональных амилоидов, а также факты, указывающие на взаимосвязь между механизмами поддержания стабильности генома и протеома. В заключение главы приведено обоснование темы исследования. Обзор литературы подготовлен обстоятельно и демонстрирует хорошее знание автором современной литературы по разрабатываемой проблеме.

В главе «Материалы и методы» представлен широкий спектр генетических и молекулярно-биологических методик и подходов, применяемых в работе, а также приведены генотипы используемых штаммов дрожжей и описаны применявшиеся плазмиды. Особое внимание уделено подробному описанию альфа-теста, который являлся одним из ключевых методов, использованных в данной работе.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием современных статистических методов анализа, адекватных поставленным задачам.

Глава «Результаты» состоит из 6 разделов, в которых представлен обширный экспериментальный материал о взаимосвязи генетических изменений и приона $[PSI^+]$. В частности, диссертантом была проведена оценка параметров мутагенеза для широкого спектра штаммов с $[PSI^+]$ и $[PIN^+]$; исследовано влияние приона $[PSI^+]$ на частоту генетических изменений различных типов; идентифицированы генетические изменения в штаммах $[PSI^+]$; проанализировано влияние приона $[PSI^+]$ на частоту дубликации генома и влияние нарушения механизмов, участвующих в поддержании стабильности генома, на частоту прионизации Sup35; установлена частота одновременного появления приона $[PSI^+]$ и изменений генома. В результате проведенных исследований было показано, что изменение параметров мутагенеза (таких как частота «незаконной» гибридизации, частота спонтанного и индуцированного УФ мутагенеза и др.) у анализируемых штаммов обусловлено генетическими изменениями в геноме, а не влиянием приона $[PSI^+]$; что такие генотоксические факторы, как нарушение рекомбинационной репарации ДНК и снижение пула предшественников синтеза ДНК, не влияют на частоту образования приона; что исследуемые мутации и прион $[PSI^+]$ не влияют на частоту возникновения друг друга и могут возникать одновременно, вероятно, под действием какого-то общего фактора. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

В разделах «Обсуждение» и «Заключение» диссертант анализирует и обобщает полученные в работе результаты и делает предположение о том, что в качестве фактора, индуцирующего и прионизацию, и возникновение мутаций может выступать окислительный стресс. Автором предложена гипотеза индукции амилоидогенеза под действием активных форм кислорода.

Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам и вытекают из проведенных экспериментов. К выводу номер 5 («Предложена модель, согласно которой ...») есть небольшое замечание – на мой взгляд, формулировка не совсем соответствует выводу. Разработка модели – это, скорее, результат работы, а вот суть этой модели – действительно, вывод.

Автореферат диссертации включает в себя описание и обсуждение основных наиболее значимых результатов проведенных исследований и отражает основное содержание работы.

Основные вопросы и замечания к диссертации

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

1. При общем достаточно высоком уровне работы она не лишена некоторых неточностей, опечаток, стилистических и пунктуационных ошибок. Кроме того, в

тексте при первом упоминании не расшифрованы некоторые аббревиатуры (например, «ЦД» - центральная догма (стр. 14), «АЛС» - амиотрофический латеральный склероз (стр. 30-31)).

2. Несмотря на то, что список литературы включает довольно большое число источников, ряд утверждений требует дополнительных ссылок. Среди них:

- текст на стр. 7-8: «Из литературы известно, что при некоторых амилоидных заболеваниях в клетках пациентов возрастает частота различных типов изменений ДНК. Например, в мозге людей, страдавших при жизни БА, обнаружены окислительные повреждения ДНК, одно- и двунитевые разрывы ДНК, повышена частота клеток с анеуплоидным и полиплоидным набором хромосом, повышена частота клеток с признаками нарушения клеточного цикла»;

- подраздел «Степени разработанности темы исследования» (где автор кратко и емко описывает накопленные литературные данные по исследуемой проблеме);

- первые 5 предложений подраздела на стр. 33;

- текст на стр. 34: «Существуют генетические заболевания, вызванные мутациями в генах, кодирующих ферменты репарации ДНК. У людей такие заболевания проявляются повышенным риском развития рака (пигментная ксеродерма) или преждевременного старения (синдром Кокейна), кроме того, среди проявлений данных заболеваний отмечают также нейродегенеративные процессы»;

- текст на стр. 36: «Действительно, в ряде исследований было показано, что анеуплоидные клетки испытывают протеотоксический стресс, вызванный нарушением протеомного баланса, в частности, стехиометрического соотношения компонентов белковых комплексов. Так, анеуплоидные штаммы дрожжей – дисомики по различным хромосомам демонстрируют повышенную чувствительность к высокой температуре, ингибиторам белкового синтеза и сворачивания белка, а также к химическим агентам и мутациям, инактивирующим протеасомную деградацию» и т.д.

3. На стр. 6 и 19 автор говорит о важной роли водородных связей в формировании амилоидов: «... в амилоидной фибрилле молекулы белка связаны между собой межмолекулярными водородными связями», «фибрилярные агрегаты, состоящие из множества соединённых между собой водородными связями белковых молекул», «амилоидные агрегаты имеют упорядоченную структуру благодаря межмолекулярным водородным связям...». Хорошо было бы хотя бы где-то упомянуть и о других взаимодействиях, которые поддерживают структуру амилоидного волокна, чтобы у читателей не создавалось впечатление, что только водородные связи обеспечивают стабильность амилоидных фибрилл.

4. На стр. 7 и 27 автор приводит в качестве примеров функциональных амилоидных фибрилл известные амилоиды животных, бактерий, дрожжей и архей. Однако по какой-то причине он упускает информацию об известных амилоидах

растений, которая, очевидно, еще больше подчеркнула бы широту распространения этих белковых форм.

5. Стр. 7-8, стр. 29, 30 автор указывает на то, что в экспериментах «повышена частота клеток с анеуплоидным и полиплоидным набором хромосом», «повышена частота клеток с признаками нарушения клеточного цикла», «обнаружена повышенная частота клеток с отклонениями от нормального набора хромосом» и др. Не совсем понятно, что означает словосочетание «частота клеток»? Это «частота выявления клеток» или что-то другое?

6. В подписи к Рис. 1 (стр. 15) дано только его название, но не хватает описания того, что изображено на схеме (что обозначают различные стрелки, почему над пунктирными стрелками где-то есть вопросы, а где-то нет). Часть этой информации есть в тексте, и можно было бы в подписи на это указать (что также не сделано), однако, лучше, чтобы все рисунки имели исчерпывающие подписи и были понятны без чтения текста. В связи с этой схемой возник еще один вопрос. Что именно означает пунктирная линия от амилоидных фибрилл к белковым конформерам? Это самодиссоциация или индуцированное разрушение амилоидов? Учитывая высокую стабильность амилоидных фибрилл, можно предположить, что разрушение индуцированное. В таком случае, полезно было бы указать факторы, под действием которых это происходит.

7. На стр. 18 автор отмечает, что «...искусственно синтезированные пептиды *in vitro* формируют гораздо более широкий спектр вариантов укладки, чем количество вариантов, формируемых *in vivo*». Здесь можно отметить, что больший структурный полиморфизм амилоидных фибрилл *in vitro*, определяется не только тем, что они формируются на основе других белков и пептидов, но и возможностью реализации более широкого спектра условий фибриллогенеза (было показано, что от этих условий в большой степени зависит структура (укладка) фибрилл на основе одного и того же белка).

8. В подписи к Рис. 2 (стр. 18) указано, что «дробление амилоидной фибриллы обеспечивает формирование новых центров полимеризации и обуславливает инфекционные свойства прионов, участие шаперонов в этом процессе показано только для прионов дрожжей». На самом деле, способность HSP (а также sHSP) фрагментировать амилоидные фибриллы уже показана и для амилоидов млекопитающих.

9. На стр. 19 автор отмечает, что «благодаря своей упорядоченной структуре амилоидные агрегаты устойчивы к ионным детергентам, такими как додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate, SDS), протеазам, действию повышенных температур и др. воздействиям». На самом деле, в большом количестве работ уже было показано, что высокая устойчивость к перечисленным воздействиям характерна не для всех амилоидов.

10. На стр. 20 указано, что «при связывании тиофлавина-Т с амилоидными фибриллами происходит смещение спектра излучения в красную область... (LeVine, 1999)». Эти представления, сформировавшиеся более 100 лет назад, уже давно были опровергнуты. Тиофлавин Т флуоресцирует в одной и той же спектральной области и в свободном состоянии в водном растворе, и в связанном с амилоидными фибриллами состоянии. Важной особенностью тиофлавина Т, которая позволяет использовать его для детекции амилоидов, является существенное возрастание квантового выхода флуоресценции (а не сдвиг спектров) красителя, что обусловлено его молекулярно-роторной природой.

11. В основном автор определяет амилоиды как агрегаты белков, но стр. 23 указывает, что «помимо патологических амилоидов, вовлеченных в развитие заболеваний, существуют также и функциональные амилоиды – белки, которые осуществляют свою физиологическую функцию в амилоидизированном виде». Хотелось бы понять, что все-таки автор понимает под амилоидами – мономерные белки или их агрегаты.

12. В экспериментах по оценке влияния приона [*PSI+*] на изменение параметров мутагенеза (стр. 66) и по изучению влияния приона на частоту появления полиплоидных колоний (стр. 75) потерю приона индуцировали сверхпродукцией белка Hsp104. Проводилась ли оценка эффективности потери приона в этих экспериментах? Эта информация (наличие соответствующих рисунков) сделала бы выводы о том, что потеря приона не приводит к восстановлению значения частоты «незаконной» гибридизации, характерного для исходного штамма [*psi-*], и не влияет на частоту полиплоидизации, более убедительными.

Нужно отметить, что сделанные замечания не влияют на общее положительное впечатление от представленной работы.

Заключение

Диссертационная работа Ю. В. Андрейчук «Исследование влияния амилоидизации белков на стабильность генетического материала у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*» является законченным научно-квалификационным исследованием, которое вносит важный вклад в понимание взаимосвязи между амилоидогенезом и возникновением генетических нарушений. Диссертационная работа соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук в соответствии с п.9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор Андрейчук Юлия Вячеславовна заслуживает присвоения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Отзыв был заслушан и утверждён на семинаре Лаборатории структурной динамики, стабильности и фолдинга белков Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук 27 марта 2024 года (протокол № 5).

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.



Ирина Ивановна Тюреева