

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Серпионова Генриха Владимировича
«Роль взаимодействий между амилоидогенными белками в возникновении и
токсичности амилоидов гентингтина человека у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.04 – Биохимия.

Амилоидогенные белки являются, на мой взгляд, одним из интереснейших и самых загадочных разделов современной биохимии и молекулярной биологии. Мое внимание всегда привлекал сам факт «безнуклеиновой наследственности», имеющей место при процессах амилоидогенности. Это, конечно, немного нескромно, но я все же сделаю отсюда вывод о высокой научной значимости данного вопроса. Его практическое значение также велико: амилоиды вызывают заболевания человека, которые на данный момент неизлечимы, и не вызывает сомнений утверждение о том, что познание фундаментальных основ амилоидогенности белков и связанных с ней механизмов приближает нас к созданию терапевтических средств борьбы с амилоидозами. Именно такое познание имеет место в диссертационной работе Генриха Владимировича Серпионова, которая посвящена исследованию процессов, приводящих к болезни Гентингтона, у модельного организма – дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Диссертация построена по стандартному плану и содержит все необходимые разделы.

Раздел «Введение» вполне достойно справляется со своей основной задачей, а именно вводит читателя в курс дела. Приведена вся необходимая информация относительно научных основ выполняемой работы, а также ее новизны и актуальности и достоверности и значимости полученных результатов. Единственное мое замечание к этому разделу относится к формулировке целей исследования, одной из которых является «сравнение механизмов токсичности мутантного гентингтина человека... у двух разных штаммов дрожжей». Необходимость исследования этого вопроса становится ясной только после чтения раздела «Результаты», а в разделе «Введение» данная цель выглядит несколько необоснованной.

Раздел «Обзор литературы» произвел на меня очень благоприятное впечатление. В нем подробно описываются амилоиды, прионы и прионные болезни, а также известные к настоящему времени молекулярные механизмы, лежащие в основе проявления разнообразных свойств прионов и амилоидов. Особое внимание уделено болезни Гентингтона и описанию дрожжевой модели данного заболевания (что не удивительно,

учитывая, что именно это и является основной тематикой работы Генриха Владимировича). В целом, после прочтения данного раздела у меня, как мне показалось, сформировалась достаточно полная картина того, что известно в настоящий момент о прионах и амилоидах, а также того, зачем Генрих Владимирович затеял свою работу. В качестве замечаний могу только посоветовать на не самые хорошие отношения, сложившиеся у автора с русским литературным языком (это, впрочем, относится ко всей работе, а не только к разделу «Обзор литературы»). В особенности это проявляется при расстановке Генрихом Владимировичем знаков препинания; такое ощущение, что они расставлены строго случайно, возможно, даже с использованием специальных компьютерных алгоритмов. Хочется также отметить опечатку на стр.17 в таблице 1 при описании дрожжевого прионного белка Сус8. В качестве нормальной функции этого белка указана транскрипционная репрессия, а прионный фенотип, приведенный в таблице, заключается в той же самой транскрипционной репрессии. В одном из этих двух случаев репрессия явно должна быть заменена на активацию. Этим мои замечания к обзору литературы и ограничиваются, из чего можно заключить, что серьезных претензий к этому разделу работы у меня нет.

Нет таковых у меня и к разделу «Материалы и методы». Генрих Владимирович использовал в своей работе достаточно умеренное количество методов, но все они описаны очень подробно и четко. Я бы только предпочел, чтобы использованные в работе олигонуклеотиды не приводились в каждой конкретной методике, а были сведены в отдельную таблицу. Не могу не процитировать фразу со стр. 52: «Все плазмиды, полученные в данной работе, были отсекуенырованы» (цитата неточная, я позволил себе правильно расставить знаки препинания). Возникает ощущение, что плазмиды были отсекуенырованы целиком, что, конечно, маловероятно. Скорее, секвенировались только вставки. На самом деле, уже по тому, что мне приходится делать такие замечания, видно, что существенных недочетов я в данном разделе работы выявить не смог, как ни старался.

Переходя к анализу раздела «Результаты и обсуждение», сразу замечу, что замечаний к нему у меня несколько больше, что, впрочем, нормально, поскольку данный раздел является самым большим по объему и самым важным по сути. Впрочем, раздел произвел на меня очень благоприятное впечатление, поскольку Генрих Владимирович действительно получил очень интересные результаты и описал их таким образом, что при приложении определенных усилий можно понять, что эти результаты означают. Автор продемонстрировал, что форма гентингина человека, в норме не образующая амилоидных агрегатов и не являющаяся токсичной, при ее синтезе в клетках дрожжей одновременно с белковыми «затравками» агрегации все же становится токсичной. При помощи нескольких

альтернативных подходов Генрих Владимирович показал, что такая токсичность действительно связана с формированием амилоидных структур. Более того, удалось показать вовлеченность белков Sup35 и Sup45 в формирование этих структур, что, по всей видимости, и является причиной токсичности, поскольку основная функция данных белков заключается в обеспечении терминации трансляции. При их включении в амилоидные структуры данный процесс не может протекать нормальным образом, в результате чего качество жизни дрожжевой клетки ухудшается. Помимо этого, Генрих Владимирович выявил феномен токсичности растворимой формы гентингина человека для клеток дрожжей в стрессовых условиях. Наконец, при помощи серии изящных экспериментов автор продемонстрировал, что даже в двух штаммах дрожжей, не очень существенно отличающихся друг от друга по генотипам, механизмы токсичности гентингина человека различны. Наконец, оказалось, что в одном из данных штаммов токсичность гентингина человека не связана с истощением свободных форм белков Sup35 и Sup45. Можно видеть, что полученные результаты крайне интересны как с точки зрения фундаментальных основ амилоидогенности белков, так и с точки зрения разработки методов лечения прионных заболеваний человека. Однако, на мой взгляд, Генрих Владимирович не избежал некоторых ошибок, причем как чисто оформительских, так и сутевых. Говоря о первых, нужно прежде всего отметить стремление Генриха Владимировича к самоцитированию. Ярче всего это проявилось в подписях к рисункам, в которых часто содержится описание метода, взятое из соответствующего раздела работы, а также выводы из этих рисунков, которые, вообще-то, логичнее смотрелись бы в основном тексте работы. Также хочется упомянуть некоторую общую нелогичность построения текста, следствием чего явились частые ситуации, когда смысл проводимых опытов становился мне ясен существенно позже их описания в тексте. Это, конечно же, затрудняет прочтение работы. Помимо этого, я вынужден упомянуть об огромном количестве жаргонизмов в тексте обсуждаемого раздела, апофеозом каких является фраза на стр.100: «Белок Sup35 бежит на фореze двумя полосами». Наконец, я полагаю, что Генриху Владимировичу имело бы смысл объединить разделы «Результаты» и «Обсуждение результатов», интегрировав второй раздел в первый сообразно с логикой проведения экспериментов. Дело в том, что описание генетических экспериментов на дрожжах с использованием гигантского количества штаммов и мутантных белков объективно сложно для восприятия, и когда читатель доходит до обсуждения какого-либо результата, он уже успел позабыть, что же это был за результат.

Перейдем теперь к конкретным замечаниям и вопросам:

1. На стр.60 на рисунке 8 приводятся результаты анализа скорости роста дрожжей при совместной продукции искусственных «затравок» агрегации и мутантного гентингина человека. Наличие некоторых затравок действительно приводит к уменьшению скорости роста (что свидетельствует о токсичности), однако в одном случае скорость роста значимо увеличивается по сравнению с контролем. Мне очень не хватило хотя бы какой-нибудь интерпретации данного результата.

2. На стр.70 на рисунке 13 приведен анализ полимерных форм амилоидогенных белков в некоторых условиях. У меня сложилось такое ощущение (хотя в работе об этом и не сказано), что в некоторых реакциях можно видеть и мономерные формы таких белков. Однако же не наблюдается никакой корреляции между количеством мономеров и полимеров (такая корреляция, исходя из самых общих соображений, должна быть строго обратной).

3. На стр.71 утверждается, что был проведен денситометрический анализ, давший интересный результат. Однако же никакой экспериментальной иллюстрации этого результата в работе нет, как нет и ссылки на какую-либо другую работу, в которой он был проведен.

4. На стр.72 утверждается, что размеры агрегатов гентингина человека и некоторых других амилоидогенных белков совпадают (и это действительно так, исходя из соответствующих иллюстраций в работе). Из этого Генрих Владимирович делает вывод, что это единые агрегаты. Мне кажется, что для такого утверждения сравнения размеров агрегатов недостаточно, поскольку никто не мешает этим агрегатам содержать только по одному амилоидогенному белку каждый и при этом быть одинакового размера.

5. На стр.81 на рисунке 18 проводится сравнение количеств различных белков в составе амилоидных полимеров. Отчетливо видны несколько полос, при этом каждая из них подписана как соответствующая определенному белку. Совершенно неясно, как именно была произведена такая идентификация.

6. На стр.89 на рисунке 22 приводятся результаты анализа скорости роста различных штаммов дрожжей на средах с галактозой и глюкозой. Можно видеть, что штаммы, хуже всего растущие на среде с галактозой (то есть те штаммы, в которых сильнее всего проявляется токсичность изучаемых амилоидогенных белков), на среде с глюкозой имеют белый цвет, в то время как нормально растущие с галактозой штаммы на среде с глюкозой окрашены в красный цвет. Цвет клеток дрожжей на глюкозосодержащей среде связан с метаболизмом аденина. Таким образом, выходит, что амилоидная токсичность нарушает метаболизм данного нуклеотида. Очень хотелось бы видеть в работе обсуждение данного феномена.

Тем не менее, я должен отметить, что все данные замечания не являются критическим, поскольку на выводы, которые Генрих Владимирович делает из своей работы, они влияют минимально и вообще являются частными. И раз уж мы перешли к выводам, отмечу, что они показались мне логичными и бесспорно вытекающими из полученных автором экспериментальных результатов.

Считаю, что диссертация Генриха Владимировича Серпионова «Роль взаимодействий между амилоидогенными белками в возникновении и токсичности амилоидов гентингина человека у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*» соответствует автореферату, и что опубликованные результаты полностью отражены в диссертации. Список публикаций включает 4 статьи в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК РФ или индексируемых МБД Scopus и Web of Science, и 4 тезиса в материалах отечественных и международных конференций. Диссертация Генриха Владимировича является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методологическом уровне и имеющей большое научное и практическое значение. По актуальности изучаемой проблемы, научной новизне, практической значимости и обоснованности выводов представленная работа соответствует требованиям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», введенного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, (ред. от 21.04.2016 № 335 и от 02.08.2016 № 748), предъявляемым ВАК РФ к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Генрих Владимирович Серпионов, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.04 – «Биохимия».

Каменский Пётр Андреевич

Профессор, доктор биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология. Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет.

Адрес: 119234, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр.12

Интернет-сайт: www.bio.msu.ru

Телефон: +7 495 9395485

E-mail: peter@protein.bio.msu.ru

«03 декабря 2018 г.»

Подпись руки д.б.н., профессора П.А.Каменского заверяю
Декан биологического факультета МГУ, академик



М.Д.Кирпичников