

«УТВЕРЖДАЮ»

проректор МГУ имени М.В. Ломоносова

Профессор А.А. Федянин



«12» мая 2014 г.

119991 Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д.1,

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

О Т З Ы В

ведущей организации на диссертацию **Бондарева Станислава Александровича**
“Влияние мутаций в прионизирующем домене белка Sup35 на свойства приона [PSI⁺]
дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*”, представленную
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.07 – “генетика”

Актуальность темы диссертационной работы

Прионы – это белки, способные существовать в нескольких конформациях, одна из которых обладает инфекционными свойствами. Детерминант [PSI⁺] – это прионная изоформа белка Sup35, который является одним из факторов терминации трансляции. Присутствие в клетках дрожжей этого приона можно легко детектировать по их фенотипу. Этот фактор является также первым описанным дрожжевым прионом, и благодаря многочисленным исследованиям является удобной моделью для описания фундаментальных принципов организации амилоидных агрегатов, обладающих прионными свойствами.

Несмотря на продолжительную историю исследований, вопрос о структурной организации амилоидных агрегатов остается очень актуальным, в особенности это касается агрегатов

белков-прионов. Эти исследования не могут быть проведены с использованием традиционных методов (например, рентгеноструктурного анализа), поскольку соответствующие белки имеют тенденцию к спонтанному образованию крупных агрегатов. *In vivo* мутационный анализ остается одним из немногих подходов, позволяющим получать сведения о структурной организации белков-прионов. Диссертация Бондарева С.А. посвящена изучению влияния мутаций в N-домене белка Sup35 на свойства приона [PSI^+]. В ходе работы автору удалось сделать предположение об ориентации полипептидных цепей в составе агрегатов Sup35p. Важно также отметить, что положения исследованных замен были выбраны не случайно, а на основании модели суперскладчатой β -структуры. Эта модель является общепринятой для объяснения основных принципов организации прионных агрегатов Sup35p. Полученные данные вносят существенный вклад в понимание фундаментальных механизмов, определяющих свойства и особенности структурной организации дрожжевых прионов.

Научная новизна и практическая значимость

Новизна диссертации не вызывает сомнений, поскольку мутации, исследованные в данной работе, получены автором впервые с помощью сайт-направленного мутагенеза, а не случайным образом. Эффекты каждой из исследованных мутаций детально описаны, а также выдвинуты предположения о молекулярных механизмах, лежащих в их основе. Теоретические результаты работы могут быть использованы в учебных спецкурсах по биохимии, молекулярной биологии и генетике, читаемых на биологических и медицинских факультетах высших учебных заведений.

Замечания по диссертационной работе

Диссертационная работа Бондарева С.А. состоит из традиционных разделов: списка сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов, списка литературы и благодарностей. Работа изложена на 119 страницах машинописного текста, содержит 43 рисунка и 7 таблиц. Список цитированной литературы насчитывает 223 наименования на русском и английском языках.

Глава «Обзор литературы» посвящена приону [PSI^+]. Автором детально рассмотрены мутации в гене *SUP35*, влияющие на стабильность фактора [PSI^+], которые известны в

литературе. Соискателем также подробно и грамотно освещены механизмы, обеспечивающие поддержание приона в клетке, явление межвидового барьера для передачи приона, различия между различными моделями структурной организации агрегатов Sup35p и вариантами приона, а также взаимосвязь $[PSI^+]$ с прионом $[PIN^+]$. Обзор литературы изложен на 41 странице, разбит на ряд подразделов и удачно иллюстрирован пятью рисунками, часть которых сделана лично автором. Материал четко структурирован, легко воспринимается и оставляет хорошее впечатление. В целом обзор литературы показывает, что Станислав Александрович детально ознакомился с работами в избранной области исследований и хорошо владеет материалом.

Замечания и вопросы к этому разделу:

1. На с. 11 автор, перечисляя различные амилоидозы, ссылается на последние обзорные статьи, а не на первоисточники.
2. На с. 25 приведено противоречие в литературных данных по вопросу полярности агрегатов Sup35p, какой точки зрения придерживается сам автор?
3. На с. 32 автор вводит обозначение Sup35Sp, но не дает его расшифровки.

Глава «Материалы и методы» занимает 15 страниц и содержит описание основных методов, использованных в работе. Автор овладел самыми разнообразными методами, начиная от традиционных методов генетики дрожжей, заканчивая современными молекулярно-генетическими методами, а также просвечивающей электронной микроскопией. Также стоит отметить, что в работе для обработки полученных результатов были использованы авторские функции, написанных в среде программирования R.

Глава «Результаты» свидетельствует о том, что автор выполнил большой объем работы и продемонстрировал свободное владение различными методами. В главе «Обсуждение» автор сопоставляет полученные данные с результатами других исследователей и формулирует гипотезы, позволяющие объяснить описанные эффекты каждой из полученных мутаций.

Вопросы к этим главам:

1. Согласно общей логике получения мутаций замены располагались в повторах аминокотерминального домена Sup35p. В то же время автор описывает новый повтор, который

не был описан ранее, однако мутации в нем не было получено. С чем связано это исключение, планирует ли автор конструировать еще одну мутацию и описывать ее эффекты?

2. В разделе 6.4 автор описывает эффекты исследуемых мутаций на различные варианты приона. Тем не менее в тексте и на рисунке 34 представлены результаты только для трех из пяти мутаций. В связи с этим возникает вопрос, какое влияние оказывают мутации *sup35-M4* и *sup35-M5* на стабильность различных вариантов $[PSI^+]$?

3. В ходе работы автором была проверена способность аллелей *sup35-M1* и *sup35-M2* индуцировать появление приона $[PSI^+]$. Проводилась ли аналогичная проверка для других мутаций?

4. По результатам работы автор делает предположение об ориентации молекул Sup35p в составе агрегатов. Выдвинутая гипотеза соответствует всем полученным данным. Тем не менее возникает вопрос, возможно ли осуществить проверку этого предположения с помощью иных методов, что бы получить прямые доказательства?

Выводы соответствуют полученным результатам.

Указанные замечания и вопросы носят дискуссионный характер и не снижают высокой научной ценности работы.

Автореферат диссертации Бондарева С.А. оформлен по всем правилам, изложен на 19 страницах, содержит 10 рисунков и 2 таблицы. Автореферат соответствует основным положениям диссертации, адекватно отражает содержание диссертации. По теме диссертации опубликовано 5 статей, данные полученные в ходе работы представлены на 6 всероссийских и международных научных конференциях.

Заключение

Диссертация “Влияние мутаций в прионизирующем домене белка Sup35 на свойства приона $[PSI^+]$ дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*” представляет собой завершённое исследование в рамках поставленных задач. Актуальность работы, ее высокий методический уровень и несомненная научная новизна позволяют сделать вывод о том, что диссертационная работа С.А. Бондарева соответствует требованиям, указанным в Положении о присуждении ученых степеней (Постановление правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842). Представленная диссертация является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей большое значение для развития генетики, а ее автор Бондарев Станислав

Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – “генетика”.

Отзыв о диссертации Бондарева С.А. утвержден на заседании кафедры генетики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова 29 апреля 2014 г. (протокол № 04-14).

Профессор кафедры генетики
биологического факультета МГУ,
доктор биологических наук



А.И. Ким

Зам. декана
биологического факультета МГУ,
профессор



А.М. Рубцов