

О Т З Ы В

на автореферат диссертации

Бондарева Станислава Александровича

“ ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ПРИОНИЗУЮЩЕМ ДОМЕНЕ БЕЛКА Sup35 НА СВОЙСТВА ПРИОНА [PSI⁺] ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*”

на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности

03.02.07 - генетика.

Актуальность исследования. Прионные формы белков являются особым классом инфекционных агентов и вызывают редкие, но тяжелые и неизлечимые нейрогенеративные заболевания у человека и млекопитающих. Важную информацию для понимания развития прионных заболеваний позволяет получить изучение механизмов размножения прионов низших эукариот. Работа Бондарева С.А. находится в русле этого актуального направления и посвящена исследованию свойств и особенностей структурной организации прионов на модели прионной изоформы [PSI⁺] белка Sup35 дрожжей *S. cerevisiae*. Белок Sup35 является фактором терминации трансляции, что позволяет легко детектировать его прионизацию в клетках дрожжей генетическими методами по фенотипу эффективности нонсенс-супрессии при предотвращении преждевременной терминации трансляции.


Оценка новизны и значимости полученных результатов. Работа обладает высокой научной новизной. Автором впервые были исследованы пять новых мутаций N-домена белка Sup35, каждая из которых локализуется в одном из пяти олигопептидных повторов домена и содержит мутации соседних полярных незаряженных аминокислотных остатков. В работе определено влияние мутаций N-домена на свойства и стабильность приона. Показано, что четыре из пяти исследованных мутаций приводят к потере прионных свойств вследствие дестабилизации супер-складчатой бета структуры агрегатов или к существенному изменению свойств приона. В результате проведенного исследования был идентифицирован (картирован) участок N-домена белка Sup35, который участвует ключевую роль в образовании супер-складчатой-бета структуры приона. Важно отметить, что автором впервые был описан эффект усиления прионных свойств белка Sup35 под влиянием одной из мутаций. На основании положения мутаций относительно супер-складчатой-бета структуры приона предложены механизмы влияния исследуемых мутаций на свойства и стабильность. Полученные автором научные результаты обладают высокой научной значимостью и вносят важный вклад в понимание фундаментальных механизмов поддержания структуры прионов. В будущем результаты исследования могут найти применение в разработке подходов для борьбы с прионными заболеваниями.

Оценка достоверности полученных результатов. Для выполнения поставленных в работе задач автором была проделана трудоемкая и длительная работа, которая потребовала сбора обширного экспериментального материала. Работа выполнена с использованием современных генетических и молекулярно-биологических методов. Для исследования структурной организации белка-приона автором был использован подход мутационного анализа *in vivo* в сочетании с исследованием морфологии фибрилл, образуемых агрегатами мутантных форм N-концевого домена Sup35, с помощью микроскопии *in vitro*. Полученные *in vivo* данные в целом согласуются с результатами экспериментов *in vitro*. Представленные в работе исследования достоверны, выводы и заключения обоснованы.

Замечания. Следует отметить, что результаты, полученные *in vivo* для одной из мутаций, не полностью согласуются с данными анализа морфологии фибрилл. Несколько неожиданным является тот факт, что мутация М3 приводит к значительному увеличению ширины и длины фибрилл, однако не оказывает влияния на свойства приона. Указанное несоответствие, вероятно, имеет свое объяснение и не снижает общей ценности и высокого уровня диссертационной работы.


Заключение. Работа представляется актуальной, является законченным научно-исследовательским трудом и выполнена автором самостоятельно на высоком научном и методическом уровне. Автореферат достаточно полно отражает суть исследования и отвечает требованиям Положения о порядке присуждения ученых степеней. Автор Бондарев Станислав Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика.

Научный сотрудник Лаборатории молекулярной генетики микроорганизмов
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики
Российской академии наук (ИМГ РАН), г. Москва
кандидат биологических наук

 /Макарова А.В./

Подпись Макаровой А.В. удостоверяю.

Ученый секретарь ИМГ РАН, кандидат биологических наук

 / Андреева Л.Е. /



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Бондарева Станислава Александровича
«Влияние мутаций в прионизующем домене белка Sup35
на свойства приона [*PSI*⁺] дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.07 «генетика»

Диссертационная работа Бондарева С.А. посвящена изучению молекулярных механизмов возникновения мутаций в N-концевом домене белка Sup35 и их влиянию на свойства приона [*PSI*⁺] у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Решаемые в ходе исследования задачи вносят существенный вклад в понимание фундаментальных механизмов, определяющих свойства и особенности структурной организации дрожжевых прионов. Актуальность, научная новизна, теоретическая и практическая значимость диссертационного исследования автором обоснованы убедительно и сомнения не вызывают. Работа злободневна и перспективна, как с фундаментальной, так и с прикладной точек зрения, особенно в связи с тем, что показана связь объекта исследования – прионов – с развитием нейродегенеративных заболеваний у человека, а изучение молекулярно-генетических механизмов организации и модификации структуры прионов на модельном объекте – клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – способствует пониманию этого медико-биологического явления.

Структура исследования имеет традиционный вид, разбита на главы, что облегчает восприятие представляемых данных. Работа написана правильным научным языком и содержит минимум стилистических и орфографических ошибок. В целом, исследование Бондарева С.А. является актуальной научной работой и характеризуется общей завершенностью сформулированных положений и выводов.

Автором использованы генетические, молекулярно-биологические и аналитические методы, характеризующие современный уровень, трудоемкость и широту проделанной работы. Результаты отражают собственные исследования автора, содержат большой фактический материал, в достаточной степени полно иллюстрированный рисунками, схемами и таблицами. Полученные данные подвергнуты статистической обработке, проведены их интерпретация и анализ.

К ключевым результатам исследования можно отнести:

1. Показана роль N-концевых олигопептидных повторов в механизмах образования и стабилизации супер-складчатой β -структуры белка Sup35.
2. Получены и охарактеризованы мутации *sup35*, приводящие как к потере приона [*PSI*⁺], так и к формированию его новых вариантов.
3. Показана зависимость эффектов мутаций *sup35^{KK}* от варианта приона [*PSI*⁺] и отсутствие зависимости от [*PIN*⁺]-статуса клетки.

4. Исследовано влияние мутаций *sup35^{KK}* на структуру агрегатов Sup35p *in vitro*.

Результаты работы опубликованы в виде статей в изданиях, рекомендованных ВАК для соискателей степени кандидата биологических наук, а также представлены на нескольких российских и зарубежных конференциях.

Достоверность диссертационного исследования определяется разнообразием проведенных экспериментов, использованием стандартных и модифицированных методик проведения экспериментов, соотносимостью с данными мировой научной литературы по теме работы.

Работа производит приятное впечатление, однако считаю необходимым указать на некоторые моменты, которые, возможно, требуют исправлений или уточнений. Текст автореферата с комментариями и правками передан соискателю, и, скорее всего, все недочеты будут устранены к моменту защиты Бондаревым С.А. диссертации.

1. Автор нигде в тексте (а лучше это сделать во вводной части) не поясняет, что такое «[PIN⁺]-статус клетки» и что такое «Hsp104». Читателю, не близко знакомому с темой прионов, немного трудно понять, откуда в тексте появляются указанные объекты.
2. Количество задач, решаемых по мере выполнения работы, не совпадает с количеством положений, выносимых на защиту, и не совпадает с количеством выводов по результатам исследования.
3. Автор практически ничего не говорит об одной из пяти полученных мутаций (а именно, *sup35-M3*) на протяжении практически всего изложения материала.
4. Вывод №2 «Первый, второй и четвертый олигопептидные повторы N-домена Sup35p участвуют в образовании супер-складчатой β-структуры» кажется категоричным, тем более, что парой абзацев выше автор при обсуждении результатов, касающихся мутации *sup35-M4*, говорит только лишь о возможном участии 4-го повтора в этом процессе.

Диссертация Бондарева Станислава Александровича «Влияние мутаций в прионизирующем домене белка Sup35 на свойства приона [PSI⁺] дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*» соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук в соответствии с «Положением ВАК РФ о порядке присуждения ученых степеней», а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 «генетика».



ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова

Подпись руки Черненко А.Ю.

ЗАВЕРЯЮ:

Нач. отдела кадров

Филибкова О.К.

«15» августа 2014г.

научный сотрудник лаборатории генетики эукариот
Отделения молекулярной и радиационной биофизики

к.б.н. Черненко А.Ю.

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Бондарева Станислава Александровича
“ВЛИЯНИЕ МУТАЦИЙ В ПРИОНИЗУЮЩЕМ ДОМЕНЕ БЕЛКА Sup35
НА СВОЙСТВА ПРИОНА [PSI +] ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*”,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.02.07 – генетика.

Диссертация С.А.Бондарева посвящена важной и актуальной теме – исследованию молекулярных механизмов, лежащих в основе агрегации прионов. Понимание этих механизмов абсолютно необходимо для разработки эффективных стратегий терапии заболеваний человека, причиной которых является образование прионов и их агрегация. Для решения данной задачи автор использовал в качестве модели прионы дрожжей, что позволило эффективно применить генетические методы для выяснения ключевых доменов и аминокислотных остатков белка Sup35, ответственных за прионизацию. Преимущество использованного автором подхода состоит в использовании направленного мутагенеза N-концевого домена Sup35, который, по предсказаниям модели супер-складчатой β -структуры, играет важную роль в формировании и стабильности амилоидных агрегатов. Интересно, что мутации в этой области ранее исследованы не были. Автору удалось продемонстрировать верность выбранной стратегии и описать ряд мутаций, которые не только нарушают процесс прионизации, но и мутацию Sup35-M4, обладающую противоположным, “усиливающим” эффектом. Для каждого случая автор предложил молекулярные механизмы, обеспечивающие мутантные фенотипы.

В своей работе С.А.Бондарев использовал широкий спектр генетических и молекулярно-биологических методов, включая электронную микроскопию, что говорит об отличной методической подготовке диссертанта. Все полученные данные подвергнуты аккуратному статистическому анализу, делающему результаты исследования убедительными и достоверными, а выводы из работы четкими и обоснованными.

Таким образом, диссертация С.А.Бондарева “Влияние мутаций в прионизирующем домене белка Sup35 на свойства приона [PSI+] дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*” представляет собой законченное научное исследование, проведенное на высоком методическом уровне, результаты которого обладают несомненной научной новизной. Считаю, что диссертация отвечает требованиям Положения о присуждении ученых степеней (Постановление правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), является научно-квалификационной работой, решающей актуальные для развития современной генетики задачи, имеющие к тому же важное практическое значение, а ее автор Бондарев

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

Игорь Игоревич Киреев



доктор биологических наук
зав. отделом электронной микроскопии
НИИ Физико-химической биологии
имени А.Н.Белозерского
МГУ имени М.В.Ломоносова



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации С.А. Бондарева "Влияние мутаций в прионизующем домене белка Sup35 на свойства приона $[PSI^+]$ дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*", представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

Изучение прионов дрожжей как удобной модели конформационных заболеваний и амилоидозов является в настоящее время одной из "горячих" тем генетики. Работа С.А. Бондарева выполнена в ведущей в мире школе по исследованию прионизации белков у дрожжей и вполне соответствует по уровню традициям этой школы. В работе описаны эффекты парных аминокислотных замен остатков глутамина или тирозина и глутамина на последовательные остатки лизина на поддержание в клетках фактора $[PSI^+]$ и агрегацию белков *in vitro*. Установлено, что аминокислотные замены, расположенные в пределах фрагмента белка, вовлеченного с формированием суперскладчатой бета-структуры приводят к потере фактора $[PSI^+]$, а мутации за пределами этих участков приводят к формированию новых вариантов приона. Сделано обоснованное предположение, что первый, второй и четвертый олигопептидные повторы N-концевого домена Sup35p участвуют в образовании суперскладчатой бета-структуры. Выяснено, что эффекты мутаций *sup35^{KK}* зависят от варианта приона $[PSI^+]$ и не зависят от $[PIN^+]$ статуса клетки. Показано, что все исследованные мутации *sup35^{KK}* влияют на структуру агрегатов Sup35p *in vitro*.

Интересным дополнением к работе могло бы стать исследование фибрилл, образуемых различными формами белка Sup35, с помощью не трансмиссионной электронной, а атомно-силовой микроскопии, приборы для которой имеются в Санкт-Петербурге, например в ПИЯФ (Гатчина). В названии диссертации следовало бы говорить не о влиянии мутаций в прионизующем домене белка Sup35 на стабильность приона, а о влиянии аминокислотных замен, поскольку именно их исследовал автор (и об этом же написана статья №1 списка публикаций по теме диссертации). Эти замечания носят рекомендательный характер и не снижают высокого общего впечатления о проделанной диссертантом работе.

По материалам диссертации в соавторстве С.А. Бондаревым опубликовано две главы в монографиях, а также три статьи в рецензируемых журналах, в том числе в высокоцитируемом издании "Journal of Biological Chemistry", где Станислав Александрович является первым автором. Помимо этого, автором опубликовано 6 тезисов в материалах конференций, на которых работа прошла серьезную апробацию.

Заключая, подчеркнем, что диссертация С.А. Бондарева "Влияние мутаций в прионизующем домене белка Sup35 на свойства приона $[PSI^+]$ дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*" на соискание ученой степени кандидата наук выполнена на высоком методическом уровне, отличается несомненной научной новизной, и является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей значение для развития генетики. Актуальность темы диссертации и уровень ее исполнения свидетельствует о том, что диссертация отвечает требованиям, указанным в Положении о присуждении ученых степеней (Постановление правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор Бондарев Станислав Александрович несомненно заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – "генетика".

Зав. лабораторией биохимической генетики
Отдела молекулярной генетики
ФГБУ "Научно-исследовательского института
экспериментальной медицины" СЗО РАМН
д.б.н., доцент

1. IX. 2014

Мандельштам



ОТЗЫВ

на автореферат диссертации **Бондарева Станислава Александровича**
«Влияние мутаций в прионизирующем домене белка Sup35 на свойства приона [PSI⁺]
дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.07 – генетика

Диссертация Станислава Александровича Бондарева посвящена изучению одной из актуальных проблем современной биологии – изучению фундаментальных механизмов поддержания структуры прионов. Такое исследование создает также предпосылки для разработки подходов к терапии заболеваний, вызываемых накоплением аномально уложенных белков.

В качестве объекта исследования автором были выбраны представители низших эукариот дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, позволяющие проводить мутационный анализ *in vivo*. Интересным подходом, использованным в работе, стало получение мутаций не случайным образом, а с помощью сайт-направленного мутагенеза, а также сочетание методов классической генетики и молекулярной биологии.

Автором показано влияние новых мутаций в N-домене белка Sup35 на свойства исследуемого приона и впервые был обнаружен эффект «усиления» фактора [PSI⁺] под действием мутации *sup35*. Описанные изменения свойств приона под действием мутаций позволили охарактеризовать молекулярные механизмы, лежащие в их основе.

Диссертация Бондарева С.А. представляет продуманное и последовательно проведенное исследование. Полученные данные апробированы на ряде международных научных форумов и в периодической печати. Выводы соответствуют содержанию автореферата и логично следуют из представленных результатов.

В целом, данную работу можно охарактеризовать как оригинальное и законченное исследование, посвященное актуальной проблеме современной биологии. Все это позволяет считать, что представленная диссертация, в полной мере удовлетворяет всем требованиям ВАК, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика, а **Бондарев Станислав Александрович**, несомненно, заслуживает присуждения ему искомой степени.

Доцент кафедры цитологии и гистологии
Биологического факультета СПбГУ, к.б.н.

Т.Г. Шапошникова

09.09.2014



Согласен *В.А. Колесов*