

ОТЗЫВ

официального оппонента 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
специальностям 03.02.07 – генетика

Амилоидозы представляют гетерогенную группу заболеваний различной этиологии. Для них характерно эндогенное образование аномальных, так называемых, амилоидных белков, которые формируют нерастворимые депозиты в разных органах и тканях, вызывая функциональные нарушения. Следует отметить, что, не смотря на большое количество исследований, патогенез этой группы заболеваний до конца не ясен, а, следовательно, и нет эффективных средств терапии. Прионный амилоидоз отличается от других амилоидозов способностью передаваться как инфекционное заболевание. Наибольшее количество прионов идентифицировано у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Это позволяет использовать их, как удобную экспериментальную систему как для исследования молекулярных механизмов прионизации, так и образования неинфекционных амилоидозов. Безусловно, понимание фундаментальных процессов, лежащих в основе этой группы заболеваний будет иметь значительный социальный эффект. В связи с вышесказанным тема диссертационного исследования Бондарева С.А. несомненно является **актуальной**.

В работе четко и корректно сформулирована **цель исследования**. Основываясь на известных свойствах приона [PSI^+] Бондарев А.С. поставил целью своей работы идентифицировать молекулярные механизмы, лежащие в основе влияния мутаций в N-домене Sup35p на свойства приона [PSI^+]. В соответствии с поставленной целью в работе были поставлены следующие задачи: охарактеризовать влияния мутантных аллелей *sup35KK* на свойства приона [PSI^+]; изучить влияния комбинаций мутантных аллелей *sup35KK* на стабильность приона [PSI^+]; проверить влияние мутантных аллелей *sup35KK* на различные варианты приона [PSI^+]; а также исследовать зависимость эффектов мутантных аллелей *sup35KK* от [PIN^+]-статуса клеток и провести анализ фибрилл, образованных мутантными белками *in vitro*. Таким образом, очевидно, что работа Бондарева С.А. представляет собой многостороннее исследование новых мутаций в

домене белка Sup35, которое вносит значительный вклад в раскрытие ключевых молекулярных механизмов прионизации белков.

Рукопись Бондарева Станислава Александровича написана традиционно и включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты, обсуждение, выводы, заключение и список литературы. Текст диссертации изложен на 119 страницах, содержит 7 таблиц, 42 рисунка и список литературы, включающий 223 ссылки.

«Обзор литературы» дает представление о свойствах прионов и амилоидов прокариот и эукариот. Наиболее подробно автор рассматривает свойства, наиболее изученного на сегодняшний день приона дрожжей, $[PSI^+]$, а также белка Sup35.

Глава «Методы исследования» свидетельствует о высокой квалификации автора как экспериментатора в области современной биологии. Использован широкий спектр генетических и молекулярно-биологических методик. Описание методов подводят нас напрямую к представлению результатов и их обсуждения, которые непосредственно связаны с использованными методическими подходами.

В последующих главах приведены результаты собственных исследований и анализ полученных данных. Экспериментальный материал изложен детально, хорошо проиллюстрирован рисунками. Выводы логичны, целиком и полностью вытекают из поставленных задач и полученных результатов. Завершается работа главой «Заключение», где суммированы и обобщены основные результаты работы.

Принципиальная новизна исследования заключается в том, что в представленной работе методом сайт-направленного мутагенеза на основании предсказаний модели суперскладчатой β -структуры, которая описывает принципы стабилизации прионных агрегатов Sup35p, получен ряд новых мутаций в N-домене белка Sup3. Также исследованы эффекты этих мутаций на свойства приона $[PSI^+]$. Показано, что две из этих мутаций приводят к потере фактора $[PSI^+]$, хотя и затрагивают участок белка, в котором раньше не было обнаружено аминокислотных замен, приводящих к потере приона. Две другие мутации приводят к формированию новых вариантов приона. В работе также рассмотрены молекулярные механизмы действия каждой из полученных мутаций. **Научная и практическая значимость** результатов несомненна.

Экспериментальные данные, лежащие в основе работы Бондарева С.А., получены на большом экспериментальном материале, с привлечением современных методов исследования, адекватных поставленным задачам, грамотно статистически обработаны. Таким образом, **достоверность и обоснованность положений и выводов диссертации** не вызывает сомнений.

В автореферате в полной мере отражены основные положения, представленные в диссертационной работе.

Личное участие автора в получении результатов диссертации подтверждается списком публикаций и результатами апробаций на российских и международных конференциях. Материалы диссертации изложены в 11 печатных работах, 3 которых в рецензируемых журналах, входящих в список ВАК РФ.

Принципиальных замечаний по результатам, полученных диссертантом, не имеется. Можно лишь отметить наличие в тексте незначительного числа опечаток. Также в подписи к рисунку 42 представлены пояснения не всех фигур, представленных на рисунке. Да и сам рисунок 42 рукописи диссертации не полностью идентичен аналогичному рисунку 9 в автореферате. Также в работе не указаны рабочие концентрации используемых антител. Основное замечание касается представления и трактовки результатов экспериментов по исследованию структуры фибрилл, образованных мутантными Sup35. Анализ фибрилл проводился по микрофотографиям в программе Image J по таким параметрам, как ширина и длина. Визуальное сравнение количества фибрилл не выявило различий между исследуемыми вариантами. Однако представленные фотографии скорее говорят об обратном. А как указывает сам автор, средняя длина фибрилл может зависеть от образования затравок. Следовательно, более тщательный анализ этого параметра мог бы способствовать более детальному изучению агрегации и эффектов мутаций на этот процесс.

Заключение. Сделанные замечания не снижают значение проведенных исследований и полученных результатов, существенно расширяющих представление о свойствах приона $[PSI^+]$ дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Диссертация «Влияние мутаций в прионизирующем домене белка Sup35 на свойства приона $[PSI^+]$ дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*» представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика, представляет собой завершённую научно-исследовательскую работу на актуальную тему и может рассматриваться как самостоятельное научное квалификационное исследование, выполненное на высоком теоретическом и практическом уровне. Выводы и рекомендации достаточно обоснованы. Работа отвечает требованиям, указанным в Положении о присуждении ученых степеней (Постановление правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842), а ее автор Бондарев Станислав Александрович заслуживает

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

Д.б.н., заместитель директора по научной работе ФГБУ «ПИАФ» НИЦ «Курчатовский институт», зав. лабораторией экспериментальной и прикладной генетики

С.В. Саранцева

188300, Ленинградская обл., г. Гатчина, Орлова роуза, ФГБУ ПИАФ svesar1@yandex.ru

08.09.2014

Саранцева Светлана Владимировна

Подпись руки Саранцевой С.В.



Голушкова О.К.

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертации

Бондарева Станислава Александровича на тему:

**"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.

На кафедре генетики СПбГУ в течение нескольких десятилетий ведутся продуктивные исследования гена SUP35 и прионизированного продукта этого гена – цитоплазматического фактора [PSI⁺]. В данной работе получены мутации в N-домене Sup35p и весьма подробно охарактеризован [PSI⁺] у пяти мутантов. Полученные результаты изложены в ряде статей как в отечественных, так и международных журналах, в частности в авторитетном Journal of Biological Chemistry, где Станислав Александрович является первым автором.

Диссертация Станислава Александровича Бондарева несомненно находится на высоком методическом и концептуальном уровне характерном для работ на кафедре генетики.

Открывает работу вполне достаточный Список сокращений на 2 страницах, разве что стоило добавить в список «**К** — лизин», столь широко используемый в работе. После списка следует традиционное и добротное “Введение”, которое занимает также 2 страницы.

“Обзор литературы” (Глава 3), занимает 32 страницы текста и иллюстрируется 5 рисунками и двумя таблицами. В обзоре квалифицированно излагается интересный материал о прионах, с упором на прионы дрожжей, особенно на [PSI⁺]. Смущают разве что некоторые неудачные формулировки, такие как «**отчасти** посвящена **именно** этой проблеме» (стр. 18), ««облако вариантов», сосуществующих вместе» (стр. 31). На стр. 32 отмечается, что NQ-богатые домены характерны для прионов. Вернее было бы написать –

прионов дрожжей. В ссылке на Liebman et al., 2012 на той же странице, все-таки лучше указать Liebman and Chernoff. При двух авторах «et al.» обычно не пишут, а указывают обе фамилии (стр.32). На стр. 34-35 вместо «замены полярных аминокислот на заряженные» более корректно было бы сказать – «замены незаряженных полярных аминокислот на заряженные». На стр. 39 не следовало писать под черно-белым рисунком «Разными цветами обозначены...». Второй абзац Заключения явно нуждается в каком-то вводном предложении, или в объединении с четко сформулированной миниглавой №4 – «Цели и задачи».

Традиционная 5 глава "Материалы и методы" занимает 15 страниц текста, иллюстрируется 4 таблицами и 2 рисунками. Методический уровень работы весьма высок. Применяемые многочисленные молекулярно-биологические, биофизические и генетические методы изложены корректно и адекватны поставленной задаче.

Полученные данные излагаются в 6 главе диссертации «Результаты». Эта часть работы занимает 34 страницы текста, иллюстрируется одной таблицей и 34 рисунками. Автором проделана немалая экспериментальная работа по характеристике полученных мутаций SUP35. Хочется отметить, что исследование подчинено четкой логике и выполнено на высоком методическом уровне. Исследовались свойства полученных мутантных Sup35p, такие как генетическая стабильность (в том числе стабильность в разных комбинациях) и возможность передачи свойств [PSI⁺] при замене мутантной *sup35* на аллель дикого типа. Изучалась зависимость фенотипа мутаций от [PIN]-фактора и варианта [PSI⁺], термостабильность измененного приона и свойства измененных фибрилл, полученных *in vitro*. Результатом является очень подробная характеристика всех полученных мутантных форм SUP35.

Все же бросаются в глаза и некоторые недостатки. На рис 23 (стр. 73) рассматриваются «небольшие различия» по размеру агрегатов Sup35p. Увы, эти различия трудно воспринимать как различия, по крайней мере на приведенной иллюстрации. (При

том, что различия по размеру агрегатов в других аналогичных экспериментах достаточно ясно выражены – см. рис. 25 и рис. 31.) На странице 73 также смущают слова о способности « $[PSI^+]$ передаваться на аллель дикого типа». (Формулировка явно неудачна, в отличие от описания самих экспериментов на стр. 64, которое не вызывает возражений.) Рис. 24 на стр. 74 кажется мало-информативным. Можно было ограничиться несколькими словами без картинки. На стр. 79 автор утверждает, что «в отдельных клетках остается **не более** одного пропегона, и только такие клетки дают начало колониям $[PSI^+]$ ». Это звучит непонятно. На стр. 84 в левой колонке на рис. 33 для верхних индексов используется явно слишком мелкая печать. На той же странице смущает формулировка «при этом какой-либо корреляции выявить не удалось». О какой корреляции идет речь? В подписях к рисункам 40 и 41 на стр. 90-91 не расшифровывается значение пустых кружочков.

Седьмая глава – “Обсуждение” – иллюстрируется двумя рисунками, занимает 12 страниц и подводит итоги проведенных экспериментов. Станислав Александрович подробно рассматривает полученные очень интересные данные в терминах модели супер-складчатой β -структуры. Обсуждение является весьма компетентным и квалифицированным. Однако возникают и некоторые вопросы к диссертанту. На стр. 93 указывается, что рис. 15 иллюстрирует влияние изученных автором мутаций на свойства различных вариантов $[PSI^+]$. Так ли это? На рис. 15 вроде о вариантах речи нет. Внутри рамки на центральной для данной работы иллюстрации (рис. 42 на стр. 95) пропущено обозначение измененной прионной конформации – салатная стрелка. К счастью, есть журнальная публикация автора, где все на месте. Да и черно-белый рисунок в автореферате помогает понять, что к чему. При чтении той же страницы 95 у оппонента возникло впечатление, что если бы ранее известная мутация *PNM* служила бы контролем во всех опытах, это позволило бы обсуждать гипотезы автора более доказательно. Но это лишь пожелание. Конечно, при планировании эксперимента где-то нужно было остановиться. На стр. 98, говоря об «уменьшении мономерного Sup35p», автор имеет в

виду количество мономеров? На стр. 99 автор говорит об увеличении ширины мутантных фибрилл. Хотелось бы узнать, не было ли сделано предварительных попыток измерить высоту фибрилл методом АСМ? На стр. 102 автор отмечает, что полученные данные говорят о том, что четвертый повтор не принимает участие в образовании β -структуры. Как это сочетается с высказыванием на стр. 104, где говорится об участии четвертого повтора в образовании супер-складчатой β -структуры?

Четыре лаконичных «Вывода» действительно вытекают из проделанной работы. При этом у оппонента создалось впечатление, что некоторые выводы могли бы быть более конкретными. Правда, этот недостаток компенсируется очень детальным изложением результатов проделанной работы в «Заключении», непосредственно предшествующей выводам.

Список литературы насчитывает 223 источника, производит серьезное впечатление и оформлен в целом тщательно. Правда, в списке несколько удивляет то, что библиографическое описание англоязычных статей везде включает русские обозначения тома и страницы («Т» и «С»), в то время как в автореферате используются на наш взгляд более корректные “Vol” (я бы, правда, использовал “V”) и “P”. В ряде ссылок отсутствуют страницы: № 12, 102, 215. Иногда отсутствует и само название журнала: ссылки № 142, 148. Бывает и так, что название журнала присутствует, но не соответствует действительности (в ссылке №32 указаны «Dokl. Akad. Nauk SSSR» вместо «Current Genetics», в №45 – «Genetics» вместо правильного «Heredity»). При этом, в упомянутой ссылке №45 содержится еще несколько ошибок. Поэтому привожу полностью правильную ссылку “Cox B.S. ψ , a cytoplasmic suppressor of super-suppressor in yeast. **Heredity**, 1965. V.20. P. 505-521.”

Кстати, хочется отметить, что ссылки на классика прионовой тематики у дрожжей, проф. Кокса в диссертационных работах последних лет часто содержат странные ошибки. Не означает ли это то, что эти работы в оригинале не читают? Впрочем, может быть я


ошибаюсь, в данном списке ошибки содержатся даже в именах некоторых уважаемых генетиков (№57, 192), несомненно знакомых диссертанту. В списке встречаются и другие мелкие погрешности, указанные нами на полях рукописи.

Отмеченные незначительные недостатки никак не влияют на общую положительную оценку данной значительной работы, выполненной на высоком современном теоретическом и методическом уровне и изложенной весьма убедительно. Автореферат достаточно полно отражает содержание диссертации. В лице Станислава Александровича СПбГУ получает высококвалифицированного и перспективного молодого специалиста по молекулярной генетике.

Рецензируемая работа имеет безусловное значение для лабораторий, занимающихся изучением молекулярной генетики дрожжей, и может быть рекомендована для применения в Институте молекулярной генетики РАН, Институте молекулярной биологии РАН, Институте цитологии РАН, С.-Петербургском институте ядерной физики РАН, Институте генетики и селекции промышленных микроорганизмов.

Диссертация Станислава Александровича Бондарева представляет собой законченную и актуальную научно-квалификационную работу. В ней содержится решение задачи, имеющей значение для развития молекулярной генетики. По методическому уровню и научной новизне данная работа, отвечает всем требованиям, указанным в Положении о присуждении ученых степеней (Постановление правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842). Бондарев Станислав Александрович, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – “генетика”.

Ведущий научный сотрудник
Института цитологии РАН,
доктор биологических наук
11 сентября 2014 г.


Т.Р. Сойдла

194064, Тихорецкий пр-д,
Санкт - Петербург
soidla39@gmail.com

Подпись руки 
№ 09.2014
Заверяю
З.з. канцелярией



Сойдла Тынч Рихович