

ОТЗЫВ

члена диссертационного совета на диссертацию Барбитова Юрия Александровича на тему «Механизмы дифференциальных эффектов шаперона Sis1 на прионы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7.- Генетика

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертация Барбитова Юрия Александровича посвящена изучению влияния одного из молекулярных шаперонов семейства Hsp40 Sis1 на жизненный цикл прионов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Принимая во внимание разнообразные функции, которые выполняют шапероны на разных этапах существования белка в клетке, а также тот факт, что нарушение пространственной структуры белка, образование амилоидов является причиной многих неизлечимых заболеваний человека, выяснение роли шаперонов в поддержании или разрушении агрегатов белка в клетке, является актуальной задачей. Большинство патогенных амилоидов человека имеют ту же архитектуру, что и охарактеризованные прионы дрожжей. Поэтому исследования механизмов взаимодействия прионов дрожжей и шаперонов могут способствовать разработке подходов к диагностике и терапии амилоидозов у млекопитающих и человека. В связи с вышесказанным диссертационная работа Барбитова Юрия Александровича является весьма актуальной и своевременной.

Для достижения цели диссертации и решения поставленных задач автор использует интегральный подход, сочетающий методы генетической инженерии, биохимии, в том числе, разные варианты электрофореза, флуоресцентной и трансмиссионной электронной микроскопии, иммунохимического анализа. Использование этих методов позволило получить информацию, отличающуюся новизной и представляющую практический интерес. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

Научная и практическая значимость работы

Полученные Барбитовым Ю.А. результаты, бесспорно, обладают научной новизной. Автором впервые показано влияние изменения локализации шаперона Sis1 на поддержание приона [PSI⁺]. Разработан новый метод анализа связывания молекулярных шаперонов с амилоидными агрегатами *in vitro* и получены количественные оценки эффективности взаимодействия шаперонов Hsp40 (Sis1), Hsp70 (Ssa1) и Hsp104 с амилоидными агрегатами прионогенных белков дрожжей. Обнаружено влияние делеции димеризационного домена Sis1 на взаимодействие с амилоидными агрегатами и на поддержание прионов. Предложена новая модель взаимодействия шаперонов с прионными агрегатами в клетках дрожжей *S. cerevisiae*.

Изучение механизмов взаимодействия прионов дрожжей и молекулярных шаперонов будет способствовать расширению представлений о подобных процессах в клетках эукариот. Предложенная методика анализа образования комплексов шаперонов с белковыми агрегатами может быть в дальнейшем использована для анализа амилоидных агрегатов белков млекопитающих и человека.

Достоверность и обоснованность результатов исследования

Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений. Обоснованность научных положений и выводов подтверждается приведенными результатами, которые получены при использовании различных современных методов, адекватных поставленным задачам, и статистически обоснованы. Основные результаты работы были представлены на 6 международных научных конференциях и опубликованы в 5 международных научных журналах, относящихся к первому и второму квартилю.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Барбитова Ю.А. построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, которая включает материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводов, списка цитированной литературы. Работа изложена на 111 страницах, иллюстрирована 21 рисунком и 6 таблицами. Список цитируемой литературы включает 209 источников.

Во введении автор подчеркивает актуальность проблемы, формулирует цель и задачи исследования, характеризует степень разработанности темы диссертации, новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, приводит положения, выносимые на защиту, и сведения о представлении полученных результатов.

Обзор литературы состоит из трех глав. Первая глава посвящена характеристике молекулярных шаперонов разных семейств, особенностям их структуры, функции и механизмов действия. Во второй главе представлены подробные сведения о различных вариантах прионов дрожжей *S. cerevisiae* и их фенотипических проявлениях. В последней главе Обзора говорится о роли шаперонов различного семейства в поддержании протеостаза и жизненном цикле прионов. В Заключении автор еще раз подчеркивает роль шаперонов в контроле качества белка в клетке, и высказывает предположение, что судьбу агрегатов белка в клетке определяют именно кошапероны Hsp40. Обзор литературы достаточно полно отражает состояние исследований в рамках темы диссертационной работы, хорошо иллюстрирован.

В главе «**Материалы и методы**» представлены использованные в работе методы генетической инженерии, биохимии, иммунохимического анализа, флуоресцентной и трансмиссионной электронной микроскопии, приведены сведения о средах и условиях культивирования штаммов дрожжей и бактерий, о структуре использованных плазмид, Все использованные методы адекватны поставленным задачам и свидетельствуют о хорошей методической подготовке автора.

В главе «**Результаты**», которая состоит из 3 разделов, представлены экспериментальные данные, позволившие автору решить поставленные задачи, получить новые интересные результаты, касающиеся роли шаперона семейства Hsp40 в жизненном цикле прионов дрожжей.

В первом разделе приведены результаты изучения влияния внутриклеточной локализации Sis1 на [PSI⁺] и [URE3]. Полученные данные свидетельствуют о том, что сверхпродукция химерного белка Sis1, слитого как с сигналом ядерного экспорта, так и с сигналом ядерной локализации, сопровождается усилением [PSI⁺] и изгнанием [URE3].

На основании этого автор делает вывод о важности локализации белка Sis1 для выполнения его функции.

В следующем разделе представлены данные исследования связывания Hsp40 с амилоидными фибриллами. Для выполнения этих исследований автором был разработан метод количественной оценки эффективности связывания шаперонов с фибриллами *in vitro*, основанный на фракционировании смеси предварительно очищенных шаперонов с фибриллами при помощи центрифугирования. Полученные результаты продемонстрировали эффективное взаимодействие белка Sis1 с фибриллами Sup35NM, но не Rnq1. При этом отсутствие димеризационного домена Sis1 снижало сродство белка к фибриллам, а мутации в олигопептидных повторах N-домена Sup35 и делеция сайта связывания с шапероном Hsp104 не оказывали влияния на взаимодействие.

Заключительный раздел этой главы посвящен выяснению взаимосвязи между связыванием шаперона Hsp40 с фибриллами и привлечением шаперонов Hsp70 и Hsp104 к фибриллам. Автором было установлено, что с фибриллами Rnq1 Hsp70 Ssa1 взаимодействует в присутствии полноразмерного Sis1. Связывание Hsp70 Ssa1 с фибриллами Sup35NM происходило только при 40-кратном избытке фибрилл по отношению к Hsp70 Ssa1. Эффективность взаимодействия при этом зависела от Sis1 и снижалась при отсутствии его димеризационного домена. Образование стабильных комплексов Hsp104 с фибриллами Sup35NM не было обнаружено независимо от присутствия или отсутствия Sis1.

В главе «Обсуждение» автор анализирует полученные результаты, сопоставляет их с данными других исследователей, обсуждает роль отдельных шаперонов семейства Hsp40 в жизненном цикле прионов дрожжей и на основании полученных результатов предлагает модель взаимодействия шаперонов Hsp40 с [PSI+] и [URE3] прионами дрожжей, а также модель взаимодействия шаперонов Hsp40, Hsp70, Hsp104 с фибриллами.

Выводы диссертации соответствуют поставленным задачам, вытекают из проведенных экспериментов, аргументированы и достоверны.

При ознакомлении с диссертацией возник ряд вопросов и замечаний:

1. Утверждение автора (с.58), «...что релокализация Sis1 в ядро за счет сверхпродукции NLSSis1 приводит к разнонаправленным эффектам на различные прионы дрожжей», не полностью отражает полученные результаты. Здесь правильнее было бы говорить не об изменении локализации Sis1 как таковой (NESSis1 и NLSSis1 изгоняют [URE3] и усиливают [PSI+]), а о локальном изменении концентрации Sis1 в определенном компартменте клетки и связанным с этим изменением соотношения компонентов аппарата контроля качества белка.
2. На с.58 есть ссылка на рис. 9Г, но этот рисунок отсутствует.
3. Как можно объяснить существенную разницу во взаимодействии Ssa1 с фибриллами Rnq1 и фибриллами Sup35NM? Не оценивали ли долю гидрофобных остатков аминокислот на поверхности фибрилл? Не сравнивали ли взаимодействие Ssa1 с фибриллами Rnq1 и фибриллами Sup35NM в присутствии конкурентного ингибитора (например, денатурированного белка)?

4. Почему для хранения препаратов шаперонов использовали такие разные буферы (варьировали состав и концентрацию солей, для Hsp104 снижали концентрацию глицерина и добавляли неионный детергент)?
5. При первом упоминании в тексте какого-либо белка необходимо хотя бы кратко назвать его функции. Так, фактор Cur1 появляется на с. 5, но о его функции мы узнаем на с. 36; Sis1 присутствует в названии работы, на с. 5, 6, но только на с. 32 говорится о его принадлежности к семейству Hsp40.

Высказанные замечания и вопросы не затрагивают основных результатов и выводов диссертации и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Диссертационная работа Барбитова Юрия Александровича является научно-квалификационной работой, которая вносит существенный вклад в понимание механизмов образования и поддержания прионов дрожжей, расширяет представления о роли молекулярных шаперонов в контроле качества белка. Полученные данные представляют интерес для специалистов в области молекулярной генетики, биохимии, молекулярной медицины.

Диссертация Барбитова Юрия Александровича на тему «Механизмы дифференциальных эффектов шаперона Sis1 на прионы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*», соответствует основным требованиям, установленным Приказом от 19.11.2021 № 11181/1 «О порядке присуждения ученых степеней в Санкт-Петербургском государственном университете», соискатель Барбитов Юрий Александрович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по научной специальности 1.5.7.- Генетика. Нарушения пунктов 9 и 11 указанного Порядка в диссертации не обнаружены.

Член диссертационного совета

Д.б.н., доцент, профессор кафедры генетики и биотехнологии



(Падкина М.В.)

Дата 09.01.2023