

## 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 молекулярных механизмов дифференциального воздействия шаперона Sis1 на прионы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Интересно, что различные шапероны по-разному влияют на поддержание наиболее изученных дрожжевых прионов, [PSI+] и [URE3]. Такие дифференциальные эффекты шаперонов на поддержание прионов представляют большой интерес для фундаментальных и прикладных исследований так как, понимание механизмов взаимодействия шаперонов с белковыми агрегатами может помочь в разработке новых методов диагностики и терапии протеинопатий человека и млекопитающих.

Для достижения цели диссертации и решения поставленных задач, автор использует методы генетики микроорганизмов, молекулярно-биологические методы работы с нуклеиновыми кислотами и белками, биохимические методы анализа взаимодействия макромолекул, флуоресцентную и электронную микроскопию. Используются различные методы статистической обработки полученных результатов. Использование этих методов позволило получить информацию, отличающуюся новизной и представляющую практический интерес. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнений.

### **Научная и практическая значимость работы**

Результаты, полученные Барбитовым Ю.А., в ходе диссертационного исследования, расширяют существующие теоретические представления о механизмах взаимодействия молекулярных шаперонов различных групп с амилоидными агрегатами в клетках эукариот. Предложенная методика анализа взаимодействия шаперонов с белковыми агрегатами может быть в дальнейшем применена для анализа амилоидных агрегатов белков человека и других млекопитающих.

### **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 отечественных и международных научных конференциях и опубликованы в отечественном и двух 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, включающей

материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводов, списка цитированной литературы и приложения.

**Объём и структура работы.** Диссертация состоит из введения и пяти глав. Полный объём диссертации составляет 111 страниц с 21 рисунком и 6 таблицами. Список литературы содержит 209 наименований.

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

**Обзор литературы** состоит из трех основных глав. Первая глава посвящена молекулярным шаперонам, истории их открытия, классификации и роли в контроле качества белка. Во второй главе подробно рассматриваются прионы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, их разнообразие и свойства. Особое внимание уделено доменной структуре белка Sup35 и наиболее изученным прионам дрожжей. В третьей главе рассматривается система контроля качества белков и ее связь с прионами дрожжей. Подробно рассматриваются шапероны, вовлеченные во взаимодействия с прионами и их функции. Представлены данные, полученные как *in vivo*, так и *in vitro*, которые свидетельствуют о роли шаперонов как в процессе формирования прионных агрегатов и прионной конверсии, так и в фрагментации амилоидных фибрилл. Обзор литературы достаточно полно отражает состояние исследований в рамках темы диссертационной работы, написан хорошим языком и хорошо иллюстрирован. В заключении приведено обоснование настоящей работы.

В главе «**Материалы и методы**» представлены использованные в работе методы генетической инженерии, флуоресцентной и электронной микроскопии, разнообразные молекулярно-биологические и биохимические методы. Приведены сведения о средах и условиях культивирования штаммов дрожжей и бактерий. 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.

В первом разделе автору удалось продемонстрировать дифференциальное влияние ко-шаперона Sis1 на прионы дрожжей. Убедительно показано, что изменение локализации белка, и по-видимому, изменение его цитоплазматической концентрации приводит к усилению фенотипа [*PSI*<sup>+</sup>] и излечиванию [*URE3*]. В дальнейшем удалось показать, что изменение внутриклеточной локализации Sis1 под действием сверхпродукции NLS Sis1 или NES Sis1 не приводит к видимому изменению размера и морфологии прионных агрегатов. Изучение влияния сверхэкспрессии варианта ко-шаперона Sis1 без домена димеризации показало, что мономерная форма не способна полностью компенсировать эффекты изменения внутриклеточной локализации Sis1 на прионы дрожжей. Это явление, наиболее вероятно, связано с тем, что такая форма имеет сниженную активность в поддержании прионов дрожжей. В следующем разделе автор изучает молекулярные механизмы влияния локализации ко-шаперона Sis1 на исследуемые прионы. Сложность задачи состоит в том, что Sis1 необходим как для фрагментации амилоидных фибрилл, так

и для излечения прионов сверхэкспрессией *HSP104*. Автор выдвигает предположение, что направление эффектов определяется балансом этих двух активностей *Sis1*. Для проверки этой гипотезы был разработан метод для количественной оценки эффективности связывания шаперонов с амилоидными фибриллами. После предварительной подготовки препаратов белков: амилоидных фибрилл и дрожжевых шаперонов, была проанализирована эффективность связывания *Sis1* с амилоидными фибриллами *Sup35NM* и *Rnq1*. Удалось показать, что *Sis1* эффективно взаимодействует с фибриллами *Sup35NM*, но не *Rnq1*.

На следующем этапе работы автор анализирует влияние мутаций в N и M доменах *Sup35* на взаимодействие *Sis1* с фибриллами *Sup35NM*. При анализе 5 мутантов, было показано, что эффективность взаимодействия *Sis1* с фибриллами была сходной для всех изученных мутантных вариантов *Sup35NM*, а оцененные при помощи нашего метода значения KD не демонстрировали значимых различий.

В третьем разделе автор изучает влияние обнаруженных различий в связывании *Hsp40* с амилоидными фибриллами на эффективность привлечения к фибриллам молекулярных шаперонов других групп (*Hsp70* и *Hsp104*). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии прямой взаимосвязи между связыванием *Hsp40* с фибриллами и привлечением к ним *Hsp70*. Кроме того, добавление *Sis1* не влияло на взаимодействие *Hsp104* с агрегатами. Полученные результаты свидетельствуют о том, что *Hsp104* не формирует стабильных комплексов с фибриллами *Sup35NM* ни в присутствии, ни в отсутствии *Sis1*; наиболее вероятно, что для связывания необходимы другие кофакторы.

В главе «Обсуждение» автор анализирует полученные результаты, сопоставляет их с данными других исследователей и формулирует основной вывод о том, что ко-шаперон *Sis1* играет важную роль в поддержании наиболее изученных прионов дрожжей. Предложена модель согласно которой, изменение внутриклеточной локализации *Sis1* и падение его цитозольной концентрации может в большей степени сказываться на удержании семян в материнской клетке ввиду того, что для протекания этого процесса необходим *Sis1*, а *Ydj1* не способен выполнять эту функцию. Напротив, фрагментация агрегатов может быть менее зависима от локализации *Sis1* за счет выполнения его функции иными белками группы *Hsp40*. В заключении рассмотрены Молекулярные механизмы дезагрегации амилоидов, обсуждаются причины несовпадения результатов автора с данными, полученными другими исследователями. Высказана гипотеза, объясняющая необходимость наличия в клетке двух независимых процессов, опосредованных системой *Hsp40/Hsp70/Hsp104*.

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

При ознакомлении с диссертацией возник ряд вопросов и замечаний:

1. В первом разделе показано, что изменение локализации белка *Sis1*, и по-видимому, изменение его цитоплазматической концентрации приводит к усилению фенотипа [*PSI+*] и излечиванию [*URE3*]. Изучали ли влияние

- концентраций этого белка в отношении sup35NM и Rnq1, которые используются в дальнейшем?
2. О чем может свидетельствовать избирательность действия ко-шаперона на прионы дрожжей?
  3. Насколько возможна экстраполяция результатов, полученных на модели дрожжей *S. cerevisiae* на процессы, происходящие в клетках млекопитающих?
  4. Следовало бы четко определить термины «изгнание приона», «излечение приона», «усиление дестабилизации приона».

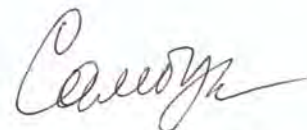
Высказанные замечания и вопросы не затрагивают основных результатов и выводов диссертации и не снижают общего положительного впечатления от работы.

Диссертационная работа Барбитова Юрия Александровича является научно-квалификационной работой, которая вносит существенный вклад в понимание механизмов амилоидогенеза, расширяет представления о роли ко-шаперона Sis1 в этом процессе. 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



(Самбук Е.В.)

Дата 21.12.2022