

# ОБЪЕДИНЕННЫЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ



## ЛАБОРАТОРИЯ РАДИАЦИОННОЙ БИОЛОГИИ

141980 г. Дубна, Московская область  
Телефон: 007 49621 62688  
Факс: 007 49621 65948

Telex: 911621 Dubna SU  
E-mail: lrb@jinr.ru  
E-mail: bugay@jinr.ru

### О Т З Ы В

официального оппонента на диссертационную работу Андрейчук Юлии Вячеславовны «Исследование влияния амилоидизации белков на стабильность генетического материала у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика

#### **Актуальность темы исследования**

Актуальность изучения механизмов образования и поддержания амилоидов и прионов и их влияния на генетическую стабильность очевидна. Известно примерно 70 тяжелых заболеваний человека и других млекопитающих, при которых обнаружено образование белковых патологических амилоидных структур, среди них неизлечимые нейродегенеративные болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и другие. Прионы вызывают у человека такие заболевания как куру, семейная фатальная бессонница, болезни Гершмана-Штройслера-Шейнкера и Кройцфельда-Якоба, проявляющиеся в необратимой дегенерации тканей мозга, что в конечном итоге приводит к смерти. В настоящее время эти заболевания неизлечимы.

При некоторых амилоидных заболеваниях в клетках пациентов наблюдается возрастание частоты различных типов изменений ДНК. Например, в мозге людей, страдавших при жизни болезнью Альцгеймера, обнаружены окислительные повреждения ДНК, одно- и двунитевые разрывы ДНК, повышена частота клеток с анеуплоидным и полиплоидным набором хромосом, повышена частота клеток с признаками нарушения клеточного цикла. Некоторые амилоидные белки могут связываться с компонентами цитоскелета, и как следствие приводить к нарушению расхождения хромосом в митозе. В некоторых случаях показана непосредственная роль амилоидных агрегатов в образовании



свободных радикалов, в частности активных форм кислорода (АФК). Один из возможных механизмов влияния окислительных повреждений на патогенез нейродегенеративных заболеваний может заключаться в том, что транскрипция на матрице ДНК с окисленными формами гуанина происходит с ошибками, и в результате последующей трансляции происходит накопление аномальных белков, не способных выполнять свои функции. При нейродегенеративных амилоидных заболеваниях увеличение частоты повреждений ДНК может быть связано не только с повышенным уровнем окислительного стресса, но и с недостаточной эффективностью ферментов систем репарации ДНК.

Несмотря на то, что сам факт взаимовлияния процессов мутагенеза и амилоидогенеза к настоящему времени получил экспериментальное подтверждение, механизмы, посредством которых может осуществляться взаимное влияние этих процессов друг на друга, а также их совместный вклад в контроль стабильности генома остаются невыясненными.

### **Новизна исследования**

Изучение взаимодействия амилоидогенеза и процессов, участвующих в поддержании стабильности генома, находится на стадии накопления данных и формирования гипотез о возможных типах связи между нарушением гомеостаза протеома и дестабилизацией генома. Существует ряд работ, посвященных исследованию отдельных аспектов такого взаимодействия. Примеры таких работ подробно рассмотрены в разделе Обзор литературы. Тем не менее, неизвестно, каким образом и посредством каких молекулярных механизмов осуществляется это взаимодействие. Неизвестно, способны ли амилоидные формы белков оказывать прямое повреждающее и мутагенное воздействие на ДНК *in vivo* или же амилоиды модифицируют процессы, участвующие в поддержании стабильности генома, индуцируя таким образом изменение частоты возникновения мутаций. Ничего не известно о возможном обратном влиянии этих процессов, а именно способности повреждений ДНК оказывать влияние на гомеостаз протеома. Данная работа направлена на исследование тех аспектов взаимодействия амилоидогенеза и мутагенеза, которые еще не были детально изучены, в частности, на установление причинно-следственной связи между возникновением приона и генетических изменений в геноме дрожжей *S. cerevisiae*. Для этого необходимо было исследовать, каким образом прионы влияют на частоту различных генетических изменений и как нарушение работы систем, участвующих в поддержании стабильности генома, влияет на частоту возникновения приона.

В данной работе было показано, что генетические изменения и прионы часто возникают в клетке одновременно, при этом нет прямого влияния генетических



изменений и прионов на возникновение друг друга. Такого рода исследование, направленное на изучение взаимодействия амилоидогенеза и процессов, участвующих в поддержании стабильности генома, было выполнено впервые. Был предположен механизм, благодаря которому можно объяснить повышенную частоту совместного возникновения генетических изменений и приона [ $\Psi^+$ ] в клетках дрожжей *S. cerevisiae*, а именно, ключевую роль в индукции амилоидогенеза играют АФК, которые повреждают различные клеточные структуры, включая белковые молекулы и генетический материал клетки.

### **Научно-практическая значимость работы**

Результаты, полученные в данной работе, имеют значение как для фундаментальной науки, так и для практических исследований в области медицины. Изучение механизмов взаимодействия матричных процессов ДНК и белков необходимы в виду важности этой проблемы для глубокого понимания механизмов наследственной и модификационной изменчивости, а также механизмов развития целого ряда социально-значимых заболеваний. К числу наиболее актуальных проблем относится вопрос о механизмах взаимовлияния мутагенеза, изменений кариотипа (анеуплоидии) и амилоидогенеза в раковых клетках, и о совместном вкладе этих процессов в “эволюцию” раковых опухолей. Во всестороннем изучении нуждаются факторы, влияющие на дестабилизацию генома на фоне амилоидогенеза белков у пациентов с болезнью Альцгеймера.

### **Достоверность результатов**

Достоверность полученных автором результатов подтверждается использованием адекватных методических приемов, а также применения стандартных статистических способов оценки их значимости. Представленные результаты, полученные разными методическими подходами, согласуются между собой и не противоречат данным, известным из литературных источников.

### **Основные научные результаты**

Для успешного решения задачи очень важен выбор правильного модельного объекта. Выбор дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в качестве модели обоснован тем фактом, что в отдельности механизмы мутагенеза и амилоидогенеза исследованы довольно глубоко особенно на этом организме. С использованием дрожжей-сахаромицетов были детально изучены пути репарации, репликации и рекомбинации ДНК, нарушения работы которых приводят к возникновению наследуемых генных, хромосомных и геномных мутаций, а



также исследованы молекулярные механизмы мутагенного действия экзогенных химических и физических факторов. Благодаря обнаружению прионов у низших эукариот, в частности у *S. cerevisiae*, у которых прионы представлены в виде нехромосомных цитоплазматических факторов, были подробно исследованы молекулярные механизмы амилоидогенеза, выявлены генетические факторы, влияющие на эффективность прионизации, а также подробно изучена структура амилоидных агрегатов. Дрожжи используют в качестве модели для изучения амилоидов млекопитающих, а также для выявления потенциальных амилоидов у других организмов и поиска антиамилоидных препаратов. У млекопитающих известен единственный прион – это PrP<sup>sc</sup>, для которого показана передача естественным путем. Инфекционные свойства амилоидов были показаны экспериментально у  $\alpha$ -синуклеина и гиперфосфорилированного тау-белка. Остальные прионы обнаружены у низших эукариот (дрожжей и других грибов). У низших эукариот прионы являются цитоплазматическими наследственными факторами, их можно передать в штамм без приона цитодукцией или с помощью трансформации клеток лизатом, полученным из штамма с прионом (инфекционные свойства). У дрожжей *S. cerevisiae* в настоящее время известно 9 прионов, наиболее изученный из них фактор терминации трансляции Sup35 или нехромосомный цитоплазматический фактор  $\Psi^+$ . Кроме них у *S. cerevisiae* было обнаружено 46 детерминантов, обладающих свойствами прионов, но не образующих амилоиды. Вовлекаемыми в амилоидные агрегаты, теоретически могут быть белки, участвующие в контроле стабильности генома. В случае дрожжевых прионов почти половина из них представляют собой транскрипционные факторы, поэтому весьма вероятно, что прионизация таких белков будет приводить к изменению экспрессии тех генов, которые эти транскрипционные факторы контролируют, в их число могут входить и гены репарации. В результате дрожжи-сахаромицеты представляют собой удобный эукариотический модельный объект, позволяющий быстро и эффективно изучить принципиальные механизмы взаимного влияния клеточных систем, контролирующей стабильность генома и амилоидогенез.

Целью работы являлось изучение взаимодействия амилоидогенеза белка Sup35 и механизмов, участвующих в поддержании стабильности генетического материала у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, при этом решались следующие задачи:

1. Исследовали влияние приона [ $\Psi^+$ ] на частоту возникновения генетических нарушений разных типов: генных, хромосомных и геномных мутаций.



С этой целью была получена коллекция, состоящая из 64 независимых штаммов, несущих прион  $[\Psi^+]$ . По результатам проделанной работы автор пришел к выводу, что сам по себе прион  $[\Psi^+]$  не оказывает влияния на частоту мутаций. В пользу этого заключения говорили следующие данные:

- не все штаммы с прионом  $[\Psi^+]$  характеризовались сниженной или повышенной частотой генетических нарушений, выявляемых с помощью альфа-теста или индукции мутаций  $\text{can}^R$ ;

- перенос  $[\Psi^+]$  в изогенный штамм без этого приона не сопровождался переносом признака пониженной или повышенной частоты незаконной гибридизации;

- изгнание приона  $[\Psi^+]$  не приводило к возврату значений частоты незаконной гибридизации к значениям, характерным для штамма  $[\Psi^-]$ ;

- в геноме всех штаммов  $[\Psi^+]$  с измененными параметрами мутагенеза выявлены изменения генетического материала различных типов – полиплоидия, удвоение отдельных хромосом, точковые мутации в кодирующей области некоторых генов. При этом в проанализированной коллекции штаммов  $[\Psi^+]$  обнаружено значительное число клонов, характеризующихся сниженной или повышенной частотой незаконной гибридизации и частотой спонтанных мутаций  $\text{can}^R$ , причём в геноме каждого из этих штаммов обнаружены какие-либо мутации.

## 2. Изучали влияние нарушений механизмов поддержания стабильности генома на частоту прионизации Sup35.

Для проверки предположения о том, что факторы, контролирующие стабильность генома, влияют на частоту появления приона, автор проверил будут ли мутагенные факторы, повышающие уровень дестабилизации генома, влиять на частоту возникновения  $[\Psi^+]$ . В качестве мутагенных факторов использовали гидроксимочевину, добавление которой в среду приводит у дрожжей к снижению пулов предшественников синтеза ДНК и повышению частоты мутаций, а также инактивацию рекомбинационной репарации посредством разрушения одного из важнейших генов этой эпистатической группы – гена *RAD52*. Мутанты *rad52Δ* обладают мутаторным фенотипом и чувствительны к ДНК-повреждающим воздействиям.

Дестабилизация генома, по крайней мере, под действием используемых мутагенных факторов, не приводила к увеличению частоты прионизации Sup35. Автор делает закономерный вывод о том, что ни один из признаков (дестабилизация генома или амилоидизация) не являются первичным по отношению друг к другу, хотя по предварительным наблюдениям среди клонов  $[\Psi^+]$  часто выявляются штаммы с



различными генными, хромосомными и геномными мутациями и измененными параметрами мутагенеза.

### 3. Определяли частоту совместного появления приона и генетических изменений.

Предполагалось, что если прион и генетические изменения возникают в клетке независимо друг от друга, то частота их совместного появления должна быть равной произведению частот каждого из перечисленных событий. Отклонение значения частоты возникновения приона и мутаций от ожидаемой свидетельствует о существовании связи между этими двумя событиями. Для оценки частоты совместного появления автор измерял частоту появления клонов с измененными параметрами мутагенеза при переходе белка Sup35 в прионную форму. Для оценки уровня мутагенеза использовали качественный тест на возникновение мутаций  $\text{can}^R$  при облучении УФ-светом. Эта частота оказалась примерно в 60 раз выше по сравнению с частотой появления таких клонов в клетках той же культуры, но в которых не произошла прионизация белка Sup35. Этот результат свидетельствует о том, что изменение параметров мутагенеза и появление приона  $[\Psi^+]$  связаны между собой. Также была измерена частота одновременного появления в клетках приона  $[\Psi^+]$  и мутаций  $\text{can}^R$ . Экспериментальная частота совместных событий оказалась примерно в 2,5 раза выше теоретически ожидаемой. Полученные экспериментальные данные указывают на существование положительной связи между возникновением приона и мутаций  $\text{can}^R$ . В соответствии с полученными результатами был сделан вывод о том, что мутации  $\text{can}^R$  и прион  $[\Psi^+]$  не влияют на частоту возникновения друг друга, и могут возникать одновременно, вероятно, под действием какого-то общего фактора. Хотя, наличие приона само по себе не влияет на частоту мутагенеза, и дестабилизация генома не приводит к повышению частоты прионизации, эти два события несомненно связаны.

Для того чтобы объяснить механизм совместного возникновения приона и генетических изменений автор предлагает гипотезу индукции амилоидогенеза, согласно которой АФК, появляющиеся в клетках в результате жизнедеятельности, окисляют молекулы белков. Молекулярные системы, контролирующие качество синтеза и укладки белков, обладают естественным уровнем неоднозначности и допускают ошибки с определенной частотой. Поврежденные молекулы, обладающих амилоидогенным потенциалом белков, иногда избегают исправления и индуцируют образование амилоидных агрегатов, привлекая молекулы белков с нормальной пространственной структурой в амилоидные полимеры. Эта конструктивная гипотеза открывает широкое поле для дальнейших экспериментов по проверке выдвинутых положений.

### **Замечания и вопросы**



Надо отметить, что наблюдалось минимальное количество грамматических и орфографических ошибок. Однако были неточности. Так на статьи *Molina-Garcia et al., 2017* и *Oyama et al., 1994* в тексте (стр. 28, 29 и стр. 37, соответственно) были даны неправильные ссылки, неправильно указан год, а в тексте на стр. 22 вместо (*Bremer, 2009*) надо (*Bremer et al., 2009*).

При описании методик иногда не хватало деталей. Например, при трансформации плазмидной ДНК использовали фрагментированную ДНК спермы лосося или нет (стр. 47); что значит пассирование на среде с гидрохлоридом гуанидина (стр. 46); как разрушали клетки – мельница, вортекс, время обработки, заморозка, ... (стр.48); какой был источник УФ-света (стр.52); при проведении проточной цитометрии действительно анализировали 100 000 клеток для каждого образца; какова чистота получаемого препарата геномной ДНК (стр. 54)?

На стр. 44 – «Все штаммы [PIN<sup>+</sup>] [PSI<sup>+</sup>], использованные в данной работе, были получены на основе клона 2 [PIN<sup>+</sup>] [psi<sup>-</sup>]», а следом приводятся рисунок и таблица, в которых используются два клона. И только на стр. 58 становится ясно, что это предложение относится к «мы получили коллекцию изогенных штаммов, несущих прион [PSI<sup>+</sup>] на фоне штамма K5-35B-Д924-ade1-14 [PIN<sup>+</sup>] [psi<sup>-</sup>]». По-видимому, это и есть клон 2.

Почти нигде не указан размер выборки колоний для определения частоты полиплоидии, размер анализируемых выборок надо было указать в Методах. В работе размер выборки указан лишь один раз и тот в конце работы.

Как долго подращивали трансформанты на селективной среде для индукции сверхэкспрессии Sup35 (стр. 46)? Надо указать в Методах, подращивали всегда одно и то же время или в каждом случае по-разному. Указано только один раз в конце работы.

При индукции приона в условиях сверхэкспрессии Sup35 велся ли контроль уровня экспрессии белка для конкретно используемых штаммов, центромерной плазмиды и условий индукции *GALI*-промотора? Могут ли вариации в частоте прионизации отражать вариации уровня сверхэкспрессии Sup35?

Получена коллекция штаммов с прионами, штаммы различаются по характеристикам. Существует вариабельность прионов между штаммами и внутри одной клетки. Например, прионы могут различаться по способности супрессировать нонсенс-мутации, а также по способности стабильно передаваться в дочерние клетки при митотическом делении. Есть ли какие-либо корреляции? Проводилось ли в рамках исследования сравнение характеристик прионов, их формы и агрегации, например, анализ агрегации флуоресцентного белка? Зависит ли организация приона от способа индукции прионизации, например, от уровня сверхэкспрессии белка?



Указанные замечания и вопросы не являются критичными и не влияют на общее положительное впечатление от работы.

### Заключение

Диссертация Андрейчук Юлии Вячеславовны «Исследование влияния амилоидизации белков на стабильность генетического материала у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*» является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой решаются важные и актуальные задачи – выяснение взаимодействия амилоидогенеза и стабильности генома на модели приона Sup35 дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. По актуальности, объему выполненных исследований, научной и практической значимости диссертационная работа Ю. В. Андрейчук соответствует всем требованиям «Положения о присуждении ученых степеней» №842 ВАК Минобрнауки РФ от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Юлия Вячеславовна Андрейчук заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – Генетика

Ведущий научный сотрудник

Лаборатории радиационной биологии

Объединенного института ядерных исследований (Дубна),


доктор биологических наук

 Н. А. Колтовая

Директор ЛРБ

Доктор физико-математических наук



 А.Н. Бугай

04.04.2024