ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Максютенко Евгении Михайловны
на тему: «Изучение механизмов адаптации к нарушениям процесса терминации трансляции у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*»
по специальности 1.5.7 – «Генетика»

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертация Е.М. Максютенко посвящена исследованию особенностей адаптации дрожжей к появлению нонсенс-мутаций в генах терминации трансляции *SUP45* и *SUP35*. Нонсенс-мутации, то есть появление преждевременных стоп кодонов в последовательности гена, вызывают синтез укороченных факторов терминации трансляции eRF1 и eRF3, не способных вызывать гидролиз пептидил-тРНК на стоп кодоне. Однако, в коллекции лаборатории, где была сделана данная работа, были обнаружены жизнеспособные штаммы с нонсенс-мутациями в факторах терминации трансляции. Поэтому, было высказано предположение, что некоторые мутации в генах *SUP45* и *SUP35* могут компенсироваться какими-то клеточными механизмами. Хотя имеется большое количество статей, исследующих особенности функционирования факторов терминации трансляции эукариот, механизмы регуляции этого процесса остаются малоизученными. Таким образом, тема данной работы крайне актуальна для исследования фундаментальных механизмов терминации трансляции.

Кроме того, известно, что около 30% генетических заболеваний вызваны появлением преждевременных стоп кодонов в кодирующих последовательностях. Таким образом, исследование механизма супрессии терминации трансляции в клетках актуально также с практической точки зрения и полученные данные могут быть использованы в разработке стратегий терапии наследственных заболеваний.

Научная и практическая значимость работы

Первая часть работы посвящена анализу данных полногеномного секвенирования двух штаммов дрожжей, использованных в работе, U-1A-D1628 и 74-D694. В результате этого анализа были обнаружены 62 хромосомные перестройки в геномах, по сравнению с референсным штаммом S288C. Далее было проведено полногеномное секвенирование и получены парные прочтения для 100 штаммов дрожжей *S. cerevisiae*, 90 из которых несли плазмиды с нонсенс-мутациями в генах факторов терминации трансляции *SUP45* или *SUP35*. Были проанализированы однонуклеотидные вариации в этих штаммах, а также проведена оценка копийности плазмид, несущих мутантные аллели. В ходе проведенного анализа обнаружено, что в штаммах, несущих мутантные гены факторов терминации, копийность плазмид, содержащих эти гены,

увеличивается. Уникальные данные были получены при исследовании митохондриальных геномов этих штаммов. Впервые обнаружено, что копийность митохондриальной ДНК также увеличивается в штаммах с мутантными факторами терминации трансляции. Кроме того, проведен анализ клеточных факторов, которые позволяют адаптироваться к подавлению терминации трансляции в результате нонсенс-мутаций. А также проведен анализ транскриптомов таких штаммов, и показаны изменения уровней экспрессии ряда генов, ответственных за регуляцию клеточного цикла. Таким образом, автором проведено глубокое исследование механизмов адаптации клеток дрожжей к нарушениям терминации трансляции, которое позволяет существенно расширить наше понимание фундаментальных процессов, происходящих в клетках эукариот в ходе биосинтеза белка.

Структура и содержание диссертации

Диссертация написана в соответствии с требованиями к оформлению диссертационных работ и включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список использованной литературы», «Благодарности». Диссертационная работа изложена на 132 страницах, содержит 38 рисунков и 9 таблиц. Во «Введении» автор формулирует цели и задачи работы, обосновывает ее актуальность, научную и практическая значимость, формулирует положения, выносимые на защиту, кратко описывает методологию исследования, личный вклад соискателя, степень достоверности и апробацию результатов.

В «Обзоре литературы» последовательно излагаются современные данные о генетике дрожжей, а также подробно освещены основные данные касающиеся терминации трансляции эукариот и, в частности, дрожжей. Обзор литературы дает полное представление о современном состоянии исследований по теме диссертации и обеспечивает теоретическую подготовку, необходимую для понимания полученных в работе новых результатов.

Глава «Материалы и методы» содержит 7 подразделов и соответствует поставленным экспериментальным и теоретическим задачам.

В главе «Результаты» описаны решения экспериментальных задач, поставленных в ходе работы. Необходимо отметить высокое экспериментальное мастерство, проявленное автором при выполнении диссертационной работы. В работе применялись современные методы, требующие исключительного профессионализма в постановке экспериментов, среди которых методы полногеномного секвенирования (Illumina, Nanopor, IonTorrent) и секвенирования транскриптомов, целый арсенал классических генетических и молекулярно-биологических методов, а также биоинформатические методы для анализа данных.

В главе «Обсуждение результатов» проведен анализ полученных данных, в ходе которого автору удалось показать, что одной из основных адаптаций к появлению нонсенс-мутаций в

факторах терминации является увеличение числа копий поврежденных генов, а также замедление клеточного цикла. В результате автором предложена непротиворечивая модель приспособления клеток дрожжей к нарушениям терминации трансляции.

Несмотря на несомненную научную ценность полученных результатов диссертационной работы, к ней имеется ряд вопросов и замечаний:

1. В обзоре литературы автор по-разному описывает механизмы терминации трансляции у высших эукариот и дрожжей, однако, если взглянуть на наборы дополнительных белков, которые участвуют в терминации трансляции дрожжей и остальных эукариот, очевидно, что они совпадают. Так как функции некоторых гомологов этих белков у дрожжей и млекопитающих описаны по-разному, в силу разных экспериментальных подходов, складывается впечатление, что механизмы терминации трансляции отличаются. Тем не менее, я считаю, что данные, полученные на дрожжах и клетках млекопитающих, могут быть объединены для описания единого механизма эукариотической терминации трансляции.

2. В разделе Материалы и методы не все экспериментальные процедуры и условия подробно описаны. Так в подразделе Молекулярно-биологические методы просто указано, что «в работе использовали стандартные молекулярные методы: выделение плазмид, рестрикцию плазмидной ДНК, полимеразную цепную реакцию, электрофорез ДНК в агарозном геле и другие» и дана одна ссылка. Мне кажется, что хотя эти методы являются уже классическими, краткое их описание было бы полезным.

3. В ходе работы автор часто ссылается на мутации генов *SUP45* и *SUP35*, обозначенные номерами (101, 102 и т.д.). При чтении диссертации было сложно соотнести полученные результаты с этими мутациями, так как мутированные позиции указаны только в таблице 2, описывающей плазмиды, использованные в работе, в разделе Материалы и методы. Полезно было бы вставить таблицу с описанием позиций этих мутаций и стоп кодонов, которые при этом появляются, в раздел Результатов, в котором они упоминаются. В тексте имеется таблица 6, содержащая мутации в исследованных плазмидах с факторами терминации, но в ней описаны другие мутации, выявленные в ходе секвенирования.

4. Так как в работе показана различная копийность генов факторов терминации и митохондриальной ДНК при различных нонсенс-мутациях, было бы интересно соотнести эти данные с позициями мутаций в факторах терминации и типами стоп кодонов, которые при этом возникают. Ведь от типа стоп кодона зависит уровень супрессии близкородственными тРНК, а от позиции стоп кодона в факторах терминации зависят функциональные свойства этих белков. Возможно, удалось бы выявить функциональные детерминанты, влияющие на копийность плазмид и мтДНК.

Хочу тем не менее отметить, что указанные вопросы и замечания не снижают достоверности и научной значимости диссертационной работы, а призваны лишь обратить внимание на некоторые аспекты, которые можно будет исследовать в будущем.

Достоверность и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Диссертационное исследование проведено на современном экспериментальном уровне. Полученные результаты обоснованы и статистически достоверны. Выводы диссертации сформулированы в соответствии с поставленными задачами и полученными результатами. Результаты диссертационной работы Максютенко Е.М. опубликованы в 2 статьях в рецензируемых журналах.

Заключение

В целом, в диссертационной работе получены уникальные важные для понимания функционирования аппарата трансляции результаты, а указанные замечания не снижают значимости диссертационного исследования. По актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне и практической значимости диссертационная работа Е. М. Максютенко «Изучение механизмов адаптации к нарушениям процесса терминации трансляции у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*» полностью соответствует п.п. 9-11, 13-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г., (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлениями Правительства РФ от 21.04.2016 №335, ред. От 01.10.2018 №1168, ред. От 20.03.2021), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Евгения Михайловна Максютенко заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 «Генетика».

Официальный оппонент:
кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий Лабораторией механизмов и контроля трансляции Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук
АЛКАЛАЕВА Елена Зиновьевна

8.04.2024

Подпись Е.З. Алкалаевой удостоверяю
Учёный секретарь ИМБ РАН
Доктор М.Н.

Контактные данные:
тел.: 7(495)1359977, e-mail: alkalaeva@eimb.ru
Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:

03.00.15 – Генетика

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Тел.: 8(499)135-23-11; e-mail: isinfo@eimb.ru