

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе Максютенко Евгении Михайловны «Изучение механизмов адаптации к нарушениям процесса терминации трансляции у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*», представленной на соискание ученой степени кандидат биологических наук по специальности 1.5.7 Генетика

### Актуальность

Ряд тяжелых наследственных заболеваний человека связан с нонсенс-мутациями в определенных генах, что приводит к полному отсутствию кодируемых ими белков. В некоторых случаях для практически полного снятия симптомов заболевания достаточно было бы добиться синтеза требуемого белка на уровне, составляющем доли процента от нормы. Поэтому одним из подходов для лечения таких заболеваний является использование средств, обеспечивающих прочтение преждевременного нонсенс-кодона как значащего. Это сопряжено с общим снижением эффективности терминации трансляции, что должно приводить к различным физиологическим последствиям. Дрожжи являются очень удобным модельным объектом для изучения причин и последствий снижения эффективности терминации трансляции у эукариот. Влияние мутаций в генах *Saccharomyces cerevisiae SUP35* и *SUP45*, кодирующих факторы терминации eRF3 и eRF1 соответственно, на точность трансляции было выявлено задолго до того, как было продемонстрирована их функция. Это позволяет использовать дрожжи в исследованиях последствий снижения эффективности терминации трансляции, которые практически невозможно было бы провести на клетках млекопитающих. Поэтому данная работа является очень актуальной как с точки зрения изучения фундаментальных механизмов взаимодействия процесса терминации трансляции с другими процессами в дрожжевой клетке, так и для понимания возможных последствий снижения функции факторов терминации у других эукариотических организмов, в том числе у человека.

## **Основные результаты, полученные в работе**

В качестве экспериментальной модели в работе были выбраны аллели генов *SUP35* и *SUP45*, несущие нонсенс-мутации. Поскольку эти гены кодируют жизненно важные факторы терминации трансляции, нонсенс-мутации в них должны были быть летальными. Однако нарушение терминации трансляции в результате этого приводит к прочтению преждевременных нонсенс-кодонов как значащих, в результате чего появляется некоторое количество недостающего фактора терминации и в определенной степени восстанавливается жизнеспособность клеток. Таким образом, получается самобалансирующаяся система с обратной связью, в которой синтез фактора терминации обеспечивается за счет недостатка этого фактора и поэтому не может достигать уровня, обеспечивающего высокую эффективность терминации трансляции. Таким образом, клетка должна адаптироваться к низкой эффективности терминации трансляции условно без увеличения этой эффективности.

С использованием штаммов с центромерными плазмидами с мутантными аллелями и штаммов с мутантными аллелями в геноме было продемонстрировано, что адаптация к нонсенс-мутациям в генах, кодирующих факторы терминации трансляции, может происходить за счет увеличения копийности этих генов.

Был проведен транскрипционный анализ штаммов с нонсенс-мутациями в генах, кодирующих факторы терминации трансляции, который показал изменение транскрипции множества генов. Среди генов с увеличенной транскрипцией высоко представленными оказались гены белков, участвующих в контроле клеточного цикла.

Кроме того, был проведен анализ митохондриальной ДНК и было выявлено, что нарушения факторов терминации трансляции приводят к увеличению количества ее копий.

## **Научная новизна и практическая ценность работы**

В работе впервые был продемонстрирован механизм адаптации клеток к нонсенс-мутациям в генах, кодирующих факторы терминации трансляции, за счет увеличения числа копий мутантных аллелей. Было продемонстрировано, что снижение количества

факторов терминации может оказывать влияние на машинерию, контролирующую прохождение клеточного цикла и обеспечивающую целостность генома. Это наблюдение является очень важным, поскольку такие риски нужно учитывать при терапии, направленной на прочтение преждевременных нонсенс-кодонов как значащих.

### **Структура диссертационной работы**

Работа построена по традиционному плану. В разделе «Введение» обоснована актуальность работы, кратко описаны предпосылки этого исследования и сформулированы задачи. В «Обзоре литературы» описано современное состояние областей научного знания, имеющих непосредственное отношение к тематике и методологии диссертационной работы. В разделе «Материалы и методы» описаны использованные в работе методики, а также штаммы и плазмиды. Результаты исследования изложены и обсуждены в соответствующих разделах. Работа изложена на 132 страницах, содержит 38 рисунков, 9 таблиц и список литературы, включающий 257 источников.

### **Основные замечания и вопросы**

Работа в основном написана хорошо и понятно, однако стиль изложения материала в отдельных случаях нельзя назвать идеальным и позволяющим легко разобраться в приводимых данных.

В формулировках задач два раза использован термин «структурные изменения». По контексту понятно, что его значение в каждом случае различается, но смысл все равно не совсем ясен.

Стр. 11 и 15: К группе *Candida* часто относят довольно удаленные друг от друга виды дрожжей, поэтому ее не корректно называть родом. *C. albicans* и *C. glabrata* относятся к разным семействам (<https://doi.org/10.3314/mmj.22.004>), поэтому их сложно назвать родственными видами.

Стр. 18: Что значит «амплификация локуса ..., как части небольшой кольцевой хромосомы»?

Стр. 22: «...анализ мтДНК у коллекции нокаутов, который выявил 130 штаммов с дизрупциями различных генов...» Почему анализировали нокауты, а выявили штаммы? Чем «нокауты» отличаются от «дизрупций»? Можно ли было использовать термин «делеция» или «инактивация»?

Стр. 34: Термин «почти родственный» - это дословный перевод с английского и в русском варианте звучит совсем непонятно. Нужно было или найти более подходящий термин или взять его в кавычки и объяснить, что он означает.

Стр. 32, 37, 38 На рисунке 6 в С-концевой области eRF3 указаны три домена, которые хорошо различимы на 3-х мерной структуре белка, а на рисунке 9 сама эта область названа С-доменом, очевидно, в соответствии с Kushnirov et al., 1988. Возможно, стоило бы либо унифицировать терминологию, либо дать пояснения, что под термином «домен eRF3» подразумеваются разные сущности в разных местах текста.

Стр. 41: В работе Valouev et al., 2002 не укорачивали С-конец eRF3, а снижали количество этого фактора, который продуцировали в виде белка без несущественных для терминации трансляции N-концевых участков.

Стр. 42: Фраза «...мутанты *sup35-n* демонстрируют сильную omnipotentную нонсенс-супрессию и приводят к продукции сниженного количества полноразмерного белка eRF3, а также укороченного фрагмента eRF3, размер которого соответствует положению преждевременного стоп-кодона...» не согласована и трудночитаема. Можно было бы сформулировать так: «...мутанты *sup35-n* проявляют сильную omnipotentную нонсенс-супрессию и у них снижено количество полноразмерного белка eRF3...». Непонятно, относительно чего «фрагмент» является «укороченным», если он уже фрагмент, и относительно чего может быть снижено его количество, если в штамме дикого типа его нет. Догадаться о смысле фразы можно, но только если знать, о чем идет речь.

Стр. 69: Таблица 6 называется «Вариации в структуре остова плазмид, несущих мутантные аллели *sup45-n* и *sup35-n*» при этом в ней указаны и мутации в генах *SUP35* и *SUP45*. Что такое тогда «остов плазмиды»?

Стр. 71: Непонятно, на основании чего было сделано заключение, что «Вероятно, повышение жизнеспособности изучаемых штаммов, содержащих мутантные аллели *sup45-n sup35-n*, обусловлено другими наследуемыми факторами, не связанными с появлением однонуклеотидных вариантов в остове этих плазмид». Хотелось бы знать, приводят ли к аминокислотным заменам SNPs в кодирующих областях *SUP35* и *SUP45*? Увеличивают ли экспрессию *SUP35* и *SUP45* мутации в промоторах?

Стр. 74: «Результаты также показывают, что запуск процессов, отвечающих за адаптацию к нарушениям терминации трансляции, происходит даже в том случае, когда в клетке наряду с мутантной аллелью *sup45-n* или *sup35-n* содержится аллель *SUP45* или *SUP35* дикого типа.» Хотелось бы подробностей, как автор пришел к такому заключению и насколько это статистически достоверно.

Стр. 87: Автор пишет, что использовал метод главных компонент для анализа данных, но нет никаких объяснений, что это за метод, какие параметры анализировались и какие «компоненты» были «главными». Этот метод не описан в разделе «Материалы и Методы». Ссылки тоже нет. Нет описания, как вычислялись значения, отложенные по осям на диаграммах рис 33 и не объяснено, что эти ГК дисперсии означают?

По тексту много раз обсуждаются «полноразмерные» и «укороченные» белки, но недостаточно четко и акцентировано объяснено, откуда они берутся. В обзоре литературы на стр. 42 есть абзац, в котором условно это объяснено. Однако лучше было бы прямо указать, что укороченный белок это результат терминации на преждевременном нонсенс-кодоне, а полноразмерный образуется в результате прочтения этого кодона как значащего, и это стоило оговаривать и в других местах, где обсуждаются эти продукты.

Основным механизмом адаптации к нонсенс-мутациям в генах факторов терминации, выявленным в работе, является амплификация мутантных аллелей. Можно предполагать, что такой же эффект должен быть у нарушений опосредованной нонсенс-кодоном деградации мРНК, а также у мутаций, увеличивающих силу промотора мутантных аллелей. Есть ли у автора объяснение, почему такие мутации не выявлялись?

Высказанные замечания не являются критическими и не снижают общей высокой оценки работы.

## Заключение

Диссертационная работа Максютенко Евгении Михайловны «Изучение механизмов адаптации к нарушениям процесса терминации трансляции у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*», является законченным научным исследованием, выполненным автором лично. В работе получены важные фундаментальные знания об адаптации клеток дрожжей к недостатку факторов терминации трансляции. По актуальности, научной и практической значимости диссертационная работа полностью соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям в пп. 9-10 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842, а ее автор Максютенко Евгения Михайловна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 «Генетика».

Ведущий научный сотрудник  
ФИЦ Биотехнологии РАН,  
доктор биологических наук

М.О. Агафонов

Специальность 1.5.4. Биохимия  
Агафонов Михаил Олегович  
Ленинский проспект д. 33 стр. 2, Москва 119071, Россия  
эл. почта [agafonov@inbi.ras.ru](mailto:agafonov@inbi.ras.ru)  
тел.: +7 (495) 954-40-97



Агафова М. О.  
2024 г.