

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук Очкасовой Анастасии Сергеевны
на тему: «Взаимодействие рибосомного белка uS3 человека с апури-
апиримидиновыми сайтами в ДНК и мРНК»
по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия

Актуальность темы диссертационной работы

Диссертационная работа А.С. Очкасовой посвящена исследованию особенностей функционирования рибосомного белка uS3 человека в репарации ДНК и контроле качества мРНК. Этот белок входит в состав малой субъединицы рибосом эукариот. Помимо его функционирования в составе рибосом, в свободной форме uS3 вовлечен в процессы репарации ДНК в ядре. Хотя имеется большое количество статей, исследующих те или иные особенности функционирования рибосомного белка uS3 человека при репарации ДНК, до сих пор механизм его работы и клеточные условия, в которых он работает, остаются малоизученными. Таким образом, тема данной диссертационной работы крайне актуальна для исследования фундаментальных механизмов репарации ДНК. Кроме того, известно, что белок uS3 участвует в ответе клетки на стрессовые условия, в первую очередь на окислительный стресс, более того он является маркером различных раковых опухолей. Таким образом, исследование механизма функционирования этого белка в клетках актуально также с практической точки зрения и полученные данные могут быть использованы в разработке стратегий контроля апоптоза и злокачественного перерождения клеток.

Научная и практическая значимость работы

Первая часть диссертационной работы посвящена исследованию репарационной функции рибосомного белка uS3 человека, а именно способности этого белка сшиваться с АП-сайтами в ДНК. В рамках диссертационной работы было проведено сравнение особенностей взаимодействия белка uS3 свободного и находящегося в составе 40S субчастиц рибосом с одноцепочечной и двуцепочечной

ДНК, , а также оценена АП-лиазная активность этого белка. Помимо этого, был проведен ChIP-seq анализ с последующим глубоким секвенированием комплексов геномной ДНК в составе хроматина с исследуемым белком для поиска специфических сайтов связывания с нуклеиновыми кислотами. Анализ данных секвенирования сайтов связывания с ДНК и сопоставление их с результатами по изучению взаимодействия коротких модельных ДНК с uS3 позволили автору работы сделать выводы об отсутствии специфических последовательностей для связывания этого белка в ДНК и о том, что белок предпочитает связываться в расплетенных областях. Это указывает на функцию данного белка в репарации АП-сайтов ДНК, которые преимущественно возникают в менее компактизованных районах хромосом из-за их большей доступности для повреждающих агентов. Таким образом, автором проведено обширное исследование функционирования рибосомного белка uS3 человека в репарации АП-сайтов, которое позволяет существенно расширить наше понимание фундаментальных процессов, происходящих в клетках эукариот при репарации ДНК.

Вторая часть работы посвящена исследованию роли белка uS3 в контроле качества мРНК на рибосоме. Автором была обнаружена АП-связывающая активность этого белка в составе зрелых 40S субъединиц рибосом на одноцепочечной ДНК. В ходе работы было высказано предположение о том, что такая активность является отражением АП-связывающей функции этого белка по отношению к соответствующим сайтам, возникающим в мРНК. Действительно, в работе четко продемонстрирована способность этого белка взаимодействовать с АП-сайтом в мРНК в ходе ее взаимодействия с транслирующей 80S рибосомой. Таким образом, в диссертационной работе А.С. Очкасовой проведено детальное исследование различных аспектов функционирования рибосомного белка uS3 человека. Необходимо также отметить, что подобное разностороннее исследование функций белка uS3 в клетках и *in vitro* ранее не проводилось и автор диссертации имеет приоритет в данном вопросе.

Диссертационная работа также вызывает большой интерес с практической точки зрения, так как данные о механизмах контроля качества мРНК и репарации

ДНК очень востребованы в качестве отправной точки для разработки методологии терапии злокачественных новообразований, а также борьбы с развитием раковых и нейродегенеративных заболеваний.

Структура и содержание диссертации

Диссертация написана в соответствии с требованиями к оформлению диссертационных работ и включает разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список цитируемой литературы». Диссертационная работа изложена на 123 страницах, содержит 36 рисунков и 3 таблицы. Во «Введении» автор формулирует цели и задачи работы, обосновывает ее актуальность, научную новизну и практическую значимость, формулирует положения, выносимые на защиту, описывает степень достоверности и апробацию результатов, а также личный вклад автора.

В «Обзоре литературы» последовательно излагаются современные данные о типах повреждения нуклеиновых кислот и клеточном ответе на эти повреждения, участии рибосомных белков в репарации ДНК и контроле качества мРНК, а также подробно освещены основные данные касающиеся биомедицинские аспекты участия рибосомных белков в этих процессах. Обзор литературы дает полное представление о современном состоянии исследований по теме диссертации и обеспечивает теоретическую подготовку, необходимую для понимания полученных в работе новых результатов. В нем процитированы новейшие публикации по данному вопросу и проведено обширное исследование научной литературы по данной теме.

К этой части работы имеется только несколько замечаний:

1. В тексте обзора имеется некоторое количество опечаток и не совсем удачных фраз или переводов иностранных терминов. Так, например, лизат ретикулоцитов кролика обычно даже в русскоязычной литературе обозначают как RRL, автор использовала не совсем стандартное сокращение ЛРК.

2. В разделе, описывающем биомедицинские аспекты участия рибосомных белков в репарации ДНК и контроле качества РНК, приведено большое количество разрозненных фактов, которые для простоты восприятия целесообразно было бы свести в единую таблицу или иллюстрацию-схему.

Глава «Материалы и методы» содержит 15 подразделов и соответствует поставленным экспериментальным задачам. Все экспериментальные процедуры и условия подробно описаны, что позволит при необходимости их воспроизвести.

В главе «Результаты и обсуждение» подробно описан ход работы при решении экспериментальных задач, поставленных в ходе работы. Необходимо отметить очень высокое экспериментальное мастерство автора. В работе применялись среди прочих новейшие методы биохимии и молекулярной биологии: получение олигонуклеотидов содержащих АП сайты и связывание с ними белков и рибосомных субчастиц, многочисленные сшивки белков с нуклеиновыми кислотами и анализ их локализации, ChIP-seq и биоинформатический анализ данных, эксперименты с изолированными рибосомами и бесклеточной трансляционной системой. Все эти методы требуют исключительного профессионализма в постановке экспериментов, который автор убедительно продемонстрировала в данной работе.

В диссертации проведено исследование функциональных свойств рибосомного белка uS3 человека. В ходе выявления сшивок этого белка с ДНК, содержащей АП сайты, показано, что он взаимодействует с такими сайтами как в свободной форме, так и в связанной с 40S субчастицами форме. При этом сайты связывания оказались разными. Далее были проведены эксперименты, показывающие, что этот белок не способен взаимодействовать с ДНК в составе незрелых пре-40S субчастиц. Помимо этого в работе был проведен поиск сайтов связывания белка uS3 с ДНК и четко показано, что данный белок взаимодействует с ДНК независимо от ее последовательности, для этого необходимы только АП сайты и более развернутая конформация ДНК. Кроме того, в работе описаны особенности функционирования uS3 в составе рибосом в цитоплазме. Обнаружено, что он способен взаимодействовать с мРНК, содержащей АП сайты и таким

образом вероятно запускать процесс деградации aberrантных рибосомных комплексов. Локализованы места сшивок в белке и позиция мРНК доступная для взаимодействия при синтезе белка. Работа выполнена на стыке биохимии и молекулярной биологии, что позволило автору получить уникальные результаты. Хочется отметить очень интересное и глубокое заключение автора о том, что имеется прямая взаимосвязь между повышением уровня свободных рибосомных белков при остановке биогенеза рибосом и участием этих белков в регуляции клеточного цикла, репарации и апоптоза.

Полученные результаты имеют несомненную высокую научную ценность, однако к диссертационной работе имеется ряд вопросов и замечаний:

1. Из текста диссертации следует, что активность не связанного с рибосомой белка uS3 в репарации АП сайтов является одной из его неканонических функций. А является ли основной функцией белка uS3 активность в составе 80S рибосом, которая запускает процесс контроля качества мРНК и деградации комплексов с АП сайтами в мРНК, обнаруженная автором работы?
2. В диссертации очень многие подписи к рисункам частично перенесены на следующую страницу вероятно, чтобы не отрывать от абзаца, в котором он упоминается, что несколько затрудняет чтение текста. С другой стороны, рисунок 24 появился в тексте через три страницы после его упоминания. Я бы порекомендовала, на будущее, избегать ситуации переноса подписей, за исключением случаев, когда рисунок занимает всю страницу.
3. В разделе 3.9, посвященном определению аминокислотных остатков белка uS3, взаимодействующих с АП сайтом ДНК, автором предпринята очень интересная попытка путем сложных логических умозаключений по сравнению подвижности сшивающихся фрагментов определить место взаимодействия. Автор этого успешно добилась, однако возникает вопрос, нельзя ли было локализовать место сшивки по идентификации модифицированных пептидов, например, масс-спектрометрически или это методически невозможно?

4. Из диссертации следует, что uS3 в составе 40S субъединиц рибосомы способен сшиваться с ДНК олигонуклеотидом, что по мнению автора указывает на его возможную функцию в связывании мРНК с АП сайтами. Однако, в дальнейшем проверка и подтверждение этой гипотезы проводилась на 80S рибосомах, а не изолированных малых субъединицах рибосом. Как автор может объяснить такой выбор? Если 40S субъединицы не взаимодействовали с мРНК, например, то почему тогда они взаимодействовали с ДНК?
5. Автор предполагает, что после сшивания белка uS3 с АП сайтом в мРНК элонгация останавливается не сразу, а могут проходить еще 1-2 раунда транслокации, однако сложно представить, что связанный с мРНК белок на поверхности рибосомы позволит ей перемещать мРНК. Нет ли другого объяснения полученным результатам, на основе которых сделан такой вывод?
6. В тексте диссертации указано, что в клетке зрелые рибосомы и ДНК локализованы в разных местах (ядре и цитоплазме) и поэтому встретиться не могут. На основании этого, сделан вывод о функциональной незначимости обнаруженного взаимодействия белка uS3 в составе 40S с АП сайтами в ДНК. Однако, автор не учитывает состояние митоза, когда ядерная стенка разрушается и содержимое цитоплазмы и ядра ненадолго контактируют друг с другом. Хотелось бы услышать мнение автора, могут ли в таком случае эти взаимодействия быть функционально значимыми?

Необходимо отметить, что все указанные вопросы и замечания ни в коей мере 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 Очкасовой А.С. опубликованы в 5 статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus.

Заключение

В целом, в диссертационной работе получены уникальные важные для понимания функционирования рибосомного белка uS3 в репарации ДНК и контроле качества мРНК результаты, а указанные замечания не снижают значимости диссертационного исследования. Диссертация соответствует требованиям пп. 2.1–2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Таким образом, соискатель Очкасова Анастасия Сергеевна, несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности 1.4.9 – биоорганическая химия.

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

3.04.2023

Контактные данные:

тел.: 7(495)1359977, e-mail: alkalaeva@eimb.ru

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

Подпись сотрудника ИМБ РАН
Е.З. Алкалаевой удостоверяю:

3.04.2023

Бочаров А.А.
Ученый секретарь ИМБ РАН

