

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА
на диссертационную работу Жданова Дмитрия Дмитриевича «Роль эндонуклеазы
EndoG в регуляции альтернативного сплайсинга пре-мРНК апоптотических белков»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по
специальности 03.01.04 – «биохимия».

Актуальность темы диссертации

Альтернативный сплайсинг (далее АлСпл) является одним из видов посттранскрипционных модификаций РНК, имеющих большое значение в регуляции экспрессии генов эукариот и представляет собой вариант сплайсинга матричных РНК, когда экспрессии гена на основе одного и того первичного транскрипта пре-мРНК может давать не одну, а множество форм белка. АлСпл заключается в том, что в результате посттранскрипционного процессинга из предшественника зрелой мРНК, вырезаются или встраиваются некодирующие последовательности нуклеотидов (интроны) и кодирующие (экзоны), при этом образуются отличающиеся по первичной структуре зрелые мРНК. В результате в разных клетках из одного и того же предшественника получаются молекулы зрелых мРНК, которые объединяют в различных комбинациях последовательности экзонов транскрибированного гена. Считается, что АлСпл является адаптационным механизмом для придания белкам необходимых функциональных и регуляторных свойств. Образование альтернативно сплайсированных мРНК находится под контролем системы факторов сплайсинга (активаторов и репрессоров), связывающихся с сайтами первичного транскрипта. Установлено, что почти половина генов человека подвергается АлСпл, в том числе и гены, участвующие в реализации апоптоза. Известно, что нарушения АлСпл могут приводить к различным нейродегенеративным заболеваниям, болезням сердечно-сосудистой и дыхательной систем, развитию опухолевых процессов. Таким образом проведенное Ждановым Дмитрием Дмитриевичем исследование тонких механизмов регуляции АлСпл является бесспорно актуальным для понимания сложной системы регуляции экспрессии генов и патогенеза ряда заболеваний.

Общие сведения о диссертации

Работа оформлена по общепринятому плану, изложена на 329 стр., имеет 78 рис. и 27 табл. и состоит из «Введения», «Обзора литературы», «Методов исследования», «Результатов исследования» «Обсуждения результатов», «Заключения», «Выводов» и «Списка цитируемой литературы», включающего 439 источников, а также «Приложения».

Содержание работы

Введение диссертационной работы касается краткой информации относительно новизны и актуальности работы, суммирования имеющегося в литературе богатого научного материала по АлСпл мРНК, определяет цель и задачи планируемого исследования, а также положения работы, которые предстоит защищать. Указывается научная и практическая ценность диссертации, публикационная активность автора.

Обзор литературы

В обзоре литературы (84 стр., 8 табл. и 15 рис.), рассматриваются виды и механизмы АлСпл, белки, участвующие в его регуляции, канонические и неканонические сплайс-сайты, вторичные структура мРНК и их роль в эффективности АлСпл, его роль в процессах дифференцировки и органогенеза, функционирования и контролируемой гибели клеток. Автором суммированы обширные данные литературы о заболеваниях, вызываемых нарушением АлСпл. Знакомство с этим разделом диссертации свидетельствует о широком научном кругозоре автора, его прекрасным знании большого экспериментального материала по теме работы. По нашему мнению, приводимый в обзоре материал может быть опубликован в виде отдельной статьи.

Методы исследования

В главе материалы и методы (25 стр.) излагаются самые современные методические подходы биохимии и молекулярной биологии, использованные в работе.

Результаты работы

Изучение роли EndoG в регуляции АлСпл мРНК и каталитической активности апоптотических белков началась со случайного обнаружения того факта, что трансфекция клеток геном EndoG (плазмидой pEndoG-GFP) вызывала замедление пролиферации клеток MCF-7 рака молочной железы человека, кроме того было установлено, что в клетках с высокой экспрессией EndoG снижалась активность теломеразы, обусловленное индукцией АлСпл мРНК каталитической субъединицы hTERT фермента.

Результатом индуцированного EndoG АлСпл мРНК hTERT в клетках MCF-7 явилось уменьшение синтеза полноразмерного активного $\alpha+\beta+$ варианта hTERT и увеличение накопления укороченного неактивного $\alpha+\beta-$ сплайс-варианта.

Одна из основных задач диссертационной работы предполагала изучение механизма индукции АлСпл под действием EndoG. Для этого сначала была исследована локализация EndoG и сплайс-вариантов внутри нормальных и апоптотических клеток. После индукции апоптоза цисплатином была получена практически гомогенная популяция апоптотических клеток. Как справедливо считает автор, вполне возможно, что, повышение уровня EndoG в цитоплазме и ядрах клеток связано с повреждающим эффектом цисплатина на ДНК, а

изменение количества $\alpha+\beta+$ и $\alpha+\beta-$ сплайс-вариантов hTERT в цитоплазме и ядрах апоптотических клеток можно объяснить повышенной экспрессией EndoG

Обнаружение $\alpha+\beta-$ сплайс-варианта мРНК в ядрах апоптотических клеток позволило автору предположить, что именно переход EndoG в ядро при апоптозе вызывает появление в нём $\alpha+\beta-$ сплайс-варианта. Далее автором было установлено, что в ядрах нормальных клеток присутствуют $\alpha+\beta-$ сплайс-вариант hTERT и его количество возрастает при апоптозе. При этом в митохондриях в норме определяются оба сплайс-варианта hTERT примерно в равных количествах. Интересно, что при апоптозе снижалось количество как $\alpha+\beta-$ сплайс-варианта hTERT, так и EndoG. Вполне логичным следует предположение соискателя о том, что уменьшение количества EndoG в митохондриях при апоптозе связано с его переходом в ядро. Далее было показано, что увеличение уровня $\alpha+\beta-$ и уменьшение пула $\alpha+\beta+$ сплайс-вариантов hTERT коррелировало со снижением активности теломеразы и возрастанием количества EndoG в ядрах и цитоплазме.

На основании полученных результатов автор предлагает гипотетическую схему регуляции АлСпл мРНК hTERT, обусловленную РНКазной активностью EndoG. Согласно этой схеме EndoG вырезает из нкРНК 48-членный РНК-олигонуклеотид EGPO (EndoG-produced oligonucleotide), комплементарный пре-мРНК. Взаимодействие EGPO и пре-мРНК hTERT вызывает АлСпл и образование $\beta-$ варианта hTERT. Примерный размер EGPO и его нуклеотидная последовательность были установлены, с помощью гибридизации ДНК-олигонуклеотидов с предполагаемой EGPO. Одним из доказательств такого механизма является активация АлСпл мРНК hTERT и снижение активности теломеразы в клеточных ядрах и в самих клетках CaCo-2 при трансфекции искусственно синтезированного EGPO.

Автор предполагает, что количество EGPO регулируется активностью EndoG, а не уровнем нкРНК, а ключевым моментом индукции АлСпл в ядрах является транслокация EndoG в ядра, и доступность нкРНК для EndoG. На участие именно EndoG в регуляции АлСпл указывает и то, что другие широко специфичные ДНКазы (ДНКаза 1 и ДНКаза X) не были способны индуцировать АлСпл мРНК hTERT.

Для последующего исследования механизма регуляции АлСпл автор выбрал мРНК апоптотических белков ДНКазы 1, каспазы-2 и BCL-x, учитывая изменение уровней их сплайс-вариантов в лимфоцитах человека, мыши и крысы, как при трансфекции геном EndoG, так и при индукции EndoG цисплатином. Оказалось, что механизм действия EndoG при индукции АС пре-мРНК ДНКазы I или Каспазы-2 был аналогичен механизму индукции АС пре-мРНК hTERT.

Далее автором была предпринята попытка оценки возможности применения EGPO с целью модуляции АлСпл целевых мРНК. Для этого трансфицировали CD4⁺ Т-лимфоциты

человека ДНК олигонуклеотидами, содержащими химические модификации для защиты от внутриклеточных РНКаз. Было установлено, что культивирование клеток, трансфицированных каждым из олигонуклеотидов, блокирующих один из регулирующих сплайсинг белков, приводило к индукции АлСпл.

Одна из задач диссертационной работы Жданова Д.Д. состояла в изучении биологического эффекта индукции АС мРНК каталитической субъединицы теломеразы hTERT. Для этого проводили культивирование клеток CD4⁺ Т-лимфоцитов человека и клеток карциномы кишечника человека CaCo-2 в течение длительного времени в условиях сверхэкспрессии EndoG после трансфекции плазмидой pEndoG-GFP. Было установлено, что снижение количества активной формы hTERT при сверхэкспрессии EndoG сопровождается уменьшением активности теломеразы и массированной гибелью клеток. При этом было выявлено укорочение теломер до критических значений и переход клеток в состояние репликативного старения, что подтверждалось увеличением экспрессии и активности ассоциированной со старением β-Gal, а также остановкой клеточного цикла в G0/G1 фазе.

Интересно, что сверхэкспрессия других апоптотических эндонуклеаз с широкой специфичностью (ДНКазы 1 и ДНКазы X) приводила к полной гибели CD4⁺ Т клеток уже через 48 ч после трансфекции и не оказывала влияния на экспрессию сплайс-вариантов мРНК hTERT), что подтверждает участие именно EndoG в индукции АС мРНК hTERT.

Один из разделов диссертации связан с оценкой роли индукции EndoG в эффекторных лимфоцитах человека в результате действия регуляторных Т клеток (Трег), имеющих важное значение для поддержания адаптивного иммунного ответа и иммунологической толерантности. В настоящей работе показано, что аутологичные Трег человека и мыши способны подавлять пролиферацию Т-, В- и NK-клеток по контакт-независимому механизму в результате индукции эндонуклеазой EndoG АлСпл мРНК hTERT (в лимфоцитах человека) и Tert (в лимфоцитах мыши), последующего ингибирования теломеразы и укорочения теломер.

Известно, что длина теломер играет важную роль в поддержании стабильности генома. Вполне справедлив вывод автора о том, что во время длительного культивирования с Трег, теломеры таргетных лимфоцитов достигают критически малой длины и клетки переходят в состояние репликативного старения, при этом массовая гибель таргетных клеток, может быть связана именно с развитием в них процессов апоптоза.

В разделе «Обсуждение результатов» всесторонне, и критически, с привлечением обширного литературного материала рассматриваются основные результаты, полученные соискателем, обосновывающие вытекающие из них выводы и положения.

В главе «Заключение» автор еще раз акцентирует внимание на новизне результатов работы, подчеркивая, что они свидетельствуют о регуляции энзиматической активности белков под влиянием EndoG, что может определять «судьбу» клеток различных организмов.

Выводы диссертации лаконичны, вытекают из полученных результатов и в достаточной степени обоснованы.

Научная новизна и практическая значимость

Оценивая научную значимость настоящего исследования, следует сказать, прежде всего, о фундаментальном, теоретическом значении полученных результатов. В первую очередь это относится к механизму инициирования механизма АлСпл, главную роль в котором отводится эндонуклеазе EndoG. Автором показана ведущая роль эндонуклеазы EndoG в образовании изоформ мРНК ряда проаптотических генов, таких как каталитической субъединицы теломеразы TERT, ДНКазыI, BCL-x и Casp-2. На основании полученных экспериментальных результатов предполагается, что при апоптозе эндонуклеаза EndoG транслоцируется из митохондрий в ядро клетки, индуцируя АлСпл мРНК ряда генов. При этом эндонуклеаза вырезает из нкРНК олигонуклеотид, названный EGPO, который комплементарен пре-мРНК целевых генов. Этот олигонуклеотид, взаимодействуя с пре-мРНК, блокирует доступ и связывание с пре-м-РНК белков, регулирующих сплайсинг, вследствие чего происходит индукция АлСпл. Автором впервые экспериментально доказано существование переключающих сплайсинг «природных» олигонуклеотидов. Такой вывод подтверждается тем, что искусственно синтезированные EGPO способны индуцировать АлСпл мРНК целевых генов, подавлять активность белков и модулировать клеточные процессы

Представляют научный интерес новые данные о способности EndoG модулировать АлСпл мРНК ДНК-азы I и снижать ее нуклеазную активность на ранних стадиях апоптоза. Это указывает на то, что АлСпл мРНК ДНК-азы I увеличивает продолжительность ранней стадии апоптоза и тормозит его прогрессирование. Интересны результаты работы, свидетельствующие о возможной роли АлСпл мРНК каталитической субъединицы теломеразы и активности теломеразы в модуляцию иммунного ответа.

Автором получены новые данные о способности аутологичных регуляторных Т-клеток человека и мыши тормозить пролиферацию Т-, В- и NK-клеток по контакт-независимому механизму, что связано с индукцией эндонуклеазой EndoG АлСпл мРНК каталитической субъединицы теломеразы в лимфоцитах.

В ходе исследования выявлена корреляция уровня экспрессии EndoG и содержания разных изоформ мРНК hTERT в Т-лимфоцитах CD4+ и CD8+. Показано, что сверхэкспрессия EndoG в Т-клетках ведет к снижению уровня мРНК полной каталитически активной формы

hTERT и повышает уровень мРНК укороченной неактивной формы hTERT. Это в свою очередь сопровождается падением теломеразной активности, уменьшением длины теломер и активацией апоптоза. Представляет интерес заключение автора о том, что индуцированный EndoG АлСпл мРНК hTERT является одним из механизмов ингибирования пролиферации эффекторных лимфоцитов регуляторными Т клетками

Практическое применение результатов проведенного Ждановым Д.Д. исследования может лежать в плоскости применения олигонуклеотидов, переключающих сплайсинг мРНК апоптотических белков, для лечения заболеваний, обусловленных нарушениями сплайсинга.

В целом диссертационная работа Жданова Д.Д. написана хорошим литературным языком, содержит минимум стилистических и орфографических погрешностей.

Материалы, имеющиеся в автореферате, полностью соответствуют экспериментальным данным диссертации и нашли отражение в 65 публикациях автора, среди которых 27 статей в профильных рецензируемых иностранных журналах, журналах входящих в список изданий, рекомендуемых ВАК РФ.

Замечания и вопросы по работе

Замечания крайне малочисленны.

1. В разделе «Приложения» две разные таблицы (№5 и 6) имеют одинаковые названия.
2. Автор использует выражение « β -галактозидазная активность» применительно к активности ассоциированной со старением β -галактозидазы. Полагаю это надо каждый раз уточнять.
3. Рис. 65. «Абсолютная длина теломер, измеренная методом ПЦР». Видимо, не стоит называть абсолютной, длину теломер, измеренную с помощью ПЦР.
4. Страница 228, внизу. Ссылку на рис. 62 В надо заменить на рис. 65Л.

Диссертация, как любая большая хорошая работа, ставит некоторые интересные вопросы, которые не могли бы возникнуть заранее.

1. Не обладает ли EndoG нуклеазной активностью относительно теломер? Потери теломерной ДНК в клетках CaCo-2 (рис. 65) составляют 1600 нуклеотидов в день, а потери теломерной ДНК лимфоцитами мыши составляют 5000 нуклеотидов в день (рис. 72 и 74). Это слишком много для простого подавления теломеразы.
2. Появление hTERT в митохондриях имеет два объяснения: это либо «бегство» теломеразы из ядра в условиях окислительного стресса, либо синтез «новой» теломеразы для митохондрий. Различие сплайсоформ hTERT может помочь в различии этих сценариев.

Заключение

Диссертация Жданова Дмитрия Дмитриевича «Роль эндонуклеазы EndoG в регуляции альтернативного сплайсинга пре-мРНК апоптотических белков» представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук, является законченным научно-квалификационным исследованием, посвященным актуальной тематике установления механизмов регуляции альтернативного сплайсинга пре-мРНК, выполненным на высоком теоретическом и экспериментальном уровне и соответствующим требованиям «Положения о присуждении ученых степеней (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24. 09. 2013 г. №842, с изменениями Постановлений Правительства РФ от 01.10.2018), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора, а сам автор Жданов Дмитрий Дмитриевич достоин присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04. - Биохимия».

Ведущий научный сотрудник ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, доктор биологических наук, по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология» и 03.03.04 – «Гистология, цитология, клеточная биология», профессор по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология»

Егоров Егор Евгеньевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)
Адрес: ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Тел: +7 (499) 135-23-11

Электронный адрес: yegorov58@gmail.com

Подпись руки заверяю, печать

Ученый секретарь ИМБ РАН
Богоров А. А.

2.03.2020

