

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию 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 исследования

Альтернативный сплайсинг (AC) мРНК, содержащих большое количество инtronов, является эффективным способом регуляции активности генов у высших эукариот, создает возможность для возникновения изоформ белков, закодированных в их генах, сочетания которых могут быть различными на уровне клеток, тканей и органов. С использованием AC на базе одного гена организм способен синтезировать отличающиеся по строению и свойствам белки. В качестве примера можно привести гены, ответственные за синтез родственных белков, участвующих в формировании цитоскелета, нервных волокон, молекул иммуноглобулинов, пептидных гормонов. Образование альтернативно сплайсированных мРНК контролируется системой транс-действующих белков (факторов сплайсинга), связывающихся с цис-сайтами первичного транскрипта. включающие активаторы и репрессоры. Механизмы AC разнообразны, их расшифровка создаёт возможность для предсказания результатов сплайсинга того или иного гена в тех или иных условиях. Нарушения AC нередко приводят к генетическим болезням человека. Аномалии правильного сплайсинга, вследствие мутаций в области нуклеотидных последовательностей около границ инtronов или экзонов, может вызывать возникновение наследственных болезней. Так, нарушенный сплайсинг пре-мРНК аргининсукиннатсинтетазы является причиной цитрулинемии, пре-мРНК глобинов приводит к различным типам талассемий, а пре-мРНК иммуноглобулинов вызывает заболевания, связанные с нарушением синтеза тяжелых цепей антител. Установлено, что аномалии AC вносят вклад в развитие у организма резистентности к химиотерапии.

На основании сказанного выше считаю, что тема диссертационной работы Жданова Дмитрия Дмитриевича, связанная с регуляцией альтернативного

сплайсинга м-РНК апоптотических белков, является несомненно актуальной для молекулярной биологии и медицины.

Структура и общие сведения о диссертации

Работа Жданова Д.Д. изложена на 329 страницах машинописного текста, построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, обсуждения полученных результатов, заключения, выводов и перечня литературы, включающего 439 источников. Диссертация иллюстрирована 78 рисунками и 27 таблицами.

Диссертацию предваряет глава «**Введение**», в которой автор коротко подчеркивает актуальность и необходимость проведения настоящего исследования, обобщает основные результаты работ других исследователей АС, ставит цели и задачи предстоящей работы, указывает основные положения, выдвигаемые на защиту, подчеркивает научно-практическую значимость исследования. Кроме того, во введении приводятся данные о публикациях и научных докладах автора на симпозиумах.

Характеристика работы

В обзоре литературы, изложенном на 84 стр. и иллюстрированном 8 табл. и 15 рис., рассматриваются виды и механизмы АС, белки, участвующие в его регуляции, канонические и неканонические сплайс-сайты, вторичная структура м-РНК и их роль в эффективности АС, роль АС в процессах дифференцировки и органогенеза, функционирования и контролируемой гибели клеток. Приводится характеристика сплайсосомы и обсуждаются этапы ее функционирования, рассматриваются строение и роль SR-белков в регуляции АС. Подробно рассматриваются белки, ответственные за регуляцию апоптотических процессов, активность которых регулируется АС. Представляет интерес раздел обзора, посвященный болезням, патогенез которых обусловлен нарушением процессов АС и функционирования сплайсосомы, а также роли АС в развитии злокачественных процессов, подчеркивается, что АС играет критическую роль в опухолеобразовании.

Самое непосредственное отношение к теме настоящей работы имеет рассмотрение переключающих сплайсинг олигонуклеотидов и их возможное

терапевтическое использование для модуляции соответствующих клеточных процессов при лечении опухолей. Подчеркивается, что все переключающие сплайсинг олигонуклеотиды являются синтетическими молекулами и фактов их природного существования найти до сих пор не удавалось.

Достаточно полно освещены такие важные вопросы как роль АС в иммунном ответе и при аутоиммунных процессах, варианты АС hTERT и связь АС hTERT с теломеразной активностью, дана классификация функций hTERT и клиническое значение сплайс-вариантов hTERT при опухолевых заболеваниях. Помимо этого обсуждаются роль апоптотических эндонуклеаз в процессе клеточной гибели, патологические состояния, связанные с дисфункцией различных ДНКаз, функциональное значение АС мРНК генов семейства BCL-2, и др. вопросы, имеющие непосредственное отношение к теме диссертации. Заключает обзор литературы раздел о регуляторных Т-клетках играющих важную роль в поддержании адаптивного иммунного ответа и иммунологической толерантности. Прочтение обзора литературы, опирающегося на самые последние по времени экспериментальные работы и критическое отношение автора к результатам др. авторов указывает на его высокую научную эрудицию и прекрасное знание литературы по теме диссертации.

Успешное решение поставленных Д.Д. Ждановым задач во многом обусловлено *применением богатого спектра современных методов* биохимии, молекулярной и клеточной биологии и иммунологии. Это позволяет высоко оценить научно-методический уровень выполненной работы и достоверность полученных автором результатов, свидетельствует о прекрасной методической подготовке автора.

В главе «*Результаты и обсуждение*» представлены основные полученные автором результаты. Они касаются: а) обнаружения способности апоптотической эндонуклеазы EndoG индуцировать АС, впервые показанной для мРНК катализитической субъединицы теломеразы человека hTERT на клетках линии MCF-7 аденокарциномы молочной железы человека; б) индукции АС мРНК TERT в лимфоцитах человека в результате сверхэкспрессии EndoG; в) способности

повреждающих ДНК агентов активировать индуцированный EndoG и альтернативный сплайсинг мРНК *hTERT* в лимфоцитах человека.

Крайне интересным является исследование способности EndoG вызывать АС мРНК других генов. Для определения мРНК генов, в сплайсинге которых участвует EndoG, экспрессию EndoG индуцировали путём трансфекции CD4⁺ Т-лимфоцитов человека, мыши и крысы плазмидой pEndoG-GFP. При анализе уровней мРНК сплайс-вариантов различных генов было установлено, что в клетках человека мыши и крысы, трансфицированных pEndoG-GFP и в клетках, инкубированных с цисплатином, изменяется количество мРНК сплайс-вариантов некоторых генов. При дальнейшем исследовании было выявлено изменение пропорции мРНК сплайс-вариантов четырёх апоптотических генов: каталитической субъединицы теломеразы, каспазы-2, дезоксирибонуклеазы 1 и BCL-x.

Известно, что EndoG локализуется в митохондриях и интернализуется в ядро только при апоптозе, тогда как АС происходит в ядрах клеток. В связи с этим возник вопрос о локализации в клетке процесса АС мРНК *hTERT* и DNase I. Для его решения была изучена внутриклеточная локализация экспрессии и определено количество мРНК EndoG и сплайс-вариантов *hTERT* и DNase I в клеточных компартментах в норме и при апоптозе опухолевых клеток или CD4⁺ Т-лимфоцитов человека. С этой целью было исследовано влияние индукции апоптоза на изменения пропорции EndoG и сплайс-вариантов *hTERT* и DNase I в цитоплазме, ядрах и митохондриях. Результаты вестерн-блоттинга свидетельствовали, что в результате развития апоптоза происходит транслокация EndoG из митохондрий в ядра и цитоплазму, что сопровождается изменением пропорции сплайс-вариантов *hTERT* и DNase I.

Одним из главных итогов диссертационной работы Д.Д. Жданова является установление того факта, что индукция АС мРНК происходит в результате РНКазной активности EndoG, результатом которой является образование переключающих АС олигонуклеотидов. Было сделано предположение, что один из таких олигонуклеотидов может вызывать делецию экзонов мРНК *hTERT*, DNase I, Casp-2 и BCL-x. Оказалось, что именно РНК, а не ДНК, расщепленная recEndoG, способна индуцировать образование мРНК сплайс-варианта $\alpha+\beta-$ *hTERT* в ядрах

клеток CaCo-2, сплайс-вариантов Δ4DNase I и Casp-2S в ядрах CD4⁺ Т-клеток человека и BCL-xS в ядрах клеток HCC1954.

Установлено, что некоторые олигонуклеотиды блокируют АС, что подтверждает правильность гипотезы. Размер EGPO составил 48 нуклеотидов для мРНК hTERT, 72 нуклеотидов для мРНК DNase I, 60 нуклеотидов для мРНК Casp-2 и 36 нуклеотидов для мРНК BCL-x. С помощью ОТ-ПЦР в реальном времени было установлено, что сверхэкспрессия EndoG вызывает увеличение количества EGPO для всех изученных мРНК.

Научная новизна и практическая значимость

Теоретическое значение работы Жданова Дмитрия Дмитриевича представляет, прежде всего, постулируемая автором гипотетическая схема нового механизма регуляции АС мРНК и каталитической активности апоптотических белков (катализитической субъединицы теломеразы TERT, Casp-2, DNase I и BCL-x). Автором экспериментально показано, что при развитии апоптоза эндонуклеаза EndoG, находящаяся в митохондриях, транслоцируется в клеточные ядра и способна индуцировать АС мРНК некоторых генов. Для этого EndoG вырезает из нкРНК активный олигонуклеотид EGPO, (EndoG-produced oligonucleotide), комплементарный пре-мРНК целевых генов, включающий 36-72 нуклеотида, причем взаимодействие EGPO с пре-м-РНК предотвращает доступ регулирующих сплайсинг белков и их связывание с пре-м-РНК, итогом чего является индукция АС. В диссертации впервые дано экспериментальное подтверждение существования «природных» переключающих сплайсинг олигонуклеотидов.

Представляют научный интерес новые данные о способности EndoG модулировать АС мРНК ДНК-азы I и снижать ее нуклеазную активность на ранних стадиях апоптоза. Это указывает на то, что АС мРНК ДНКазы I увеличивает продолжительность ранней стадии апоптоза и тормозит его прогрессирование. Интересны и результаты работы, свидетельствующие о возможной роли АС мРНК каталитической субъединицы теломеразы и активности теломеразы в модуляции 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 АС 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 АС мРНК hTERT является одним из механизмов ингибирования пролиферации эффекторных лимфоцитов регуляторными Т клетками.

Что касается практической важности настоящей работы, то они открывают возможность применения переключающих сплайсинг олигонуклеотидов, как потенциальных терапевтических агентов при лечении заболеваний, связанных с нарушением АС мРНК.

Автореферат диссертации полностью соответствует требованиям ВАК. Материалы автореферата соответствуют основным положениям диссертации.

Степень обоснованности научных результатов, выводов и рекомендаций

Основные положения, выносимые на защиту, выводы и рекомендации, данные в работе, хорошо обоснованы и подтверждены публикациями в российских и международных журналах. Основные направления исследований Жданова Дмитрия Дмитриевича, включают в себя:

- поиск мРНК белков, в регуляции АС которых участвует EndoG;
- изучение EndoG-зависимого механизма регуляции АС мРНК;
- оценку возможности модуляции АС при помощи образуемых под действием EndoG переключающих сплайсинг олигонуклеотидов;
- изучение биологического эффекта индукции АС мРНК апоптотических белков TERT, Casp-2, DNase I и BCL-x;

- оценку роли индукции EndoG в эффекторных лимфоцитах человека в результате действия регуляторных Т клеток.

Достоверность научных положений, выводов и рекомендаций

Достоверность научных результатов не вызывает сомнений. Экспериментальная часть работы выполнена с использованием современной научной базы. Выводы диссертации согласуются с известными теоретическими и практическими знаниями.

Полнота изложения основных результатов диссертации в научной печати

По материалам диссертации опубликовано 65 работ, в том числе 27 статей в научных рецензируемых изданиях.

Основные положения диссертационной работы представлены в виде устных и стеновых докладов, преимущественно на международных конференциях. Высокая публикационная активность, несомненно, подчёркивает актуальность выполненных исследований и перспективу полученных в работе результатов.

Оценка содержания диссертации в целом, замечания и вопросы по диссертации.

Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Полученные Д.Д. Ждановым результаты не вызывают сомнений, выводы работы надежно подкреплены экспериментальными данными и являются обоснованными.

К работе есть несколько замечаний.

1. Цель работы сформулирована слишком расплывчата. Задачи не сформулированы в экспериментальных терминах. Выдвинутая цель работы больше похожа на общую декларацию, а задачи - на цель работы.

2. Выдвижение задачи 4 никак в тексте не обосновано, ее связь с исследованием EndoG непонятна. По мере чтения текста диссертации становится ясно, что имеются ввиду гены, выявленные в процессе выполнения задачи 1, но при изначальной формулировке задач они не могли быть известны.

3. Отсутствует отдельная часть в обзоре литературы, посвященная основному объекту исследования - эндонуклеазе G. Некоторая информация

содержится лишь в п. 2.9. Это несколько затрудняет понимание предпосылок работы и сформулированных целей, а также степени новизны работы.

4. П.4.6.1. Отмечается, что обнаружено изменение количества мРНК сплайсвариантов 28-ми генов. Далее пишется, что " дальнейшее исследование проводили на мРНК данных апоптотических генов". Из текста совершенно не понятно, обнаружен ли АС мРНК всего 28 генов в целом, или из всех обнаруженных вариантов 28 были апоптотическими, или все обнаруженные варианты были апоптотическими.

5. Нумерация страниц в оглавлении с ошибками.

6. П. 4.8.2. Предложение: "Снижение активности теломеразы, вероятнее всего, происходит за счёт уменьшения количества полноразмерного Casp-2L варианта, поскольку именно эта форма обладает каталитической активностью" вызывает недоумение. Совершенно не понятно, как синтез каталитически неактивной формы каспазы ведет к снижению активности теломеразы.

7. В работе говорится о транслокации EndoG в ядро. Однако из рис. 42 видно, что количество EndoG в цитоплазме и ядре одинаково. Таким образом, концентрация этого белка в ядре возрастает потому, что она возрастает в цитоплазме из-за разрушения митохондрий, стандартном процессе при апоптозе. Говорить о специфичном перемещении EndoG в ядро по предоставленным данным, на мой взгляд, не обоснованно.

8. В п.4.11.6 описывается появление альтернативных сплайсоформ в цитоплазматической фракции при инкубировании с рекомбинантной EndoG. Это требует серьезного объяснения, т.к. сплайсосомы локализованы в ядре. Каким образом происходит сплайсинг в цитоплазме? Что служит субстратом, если в цитоплазме находится уже зрелая РНК?

Однако высказанные замечания замечания не меняют общего хорошего впечатления о выполненной работе и ее высокой научной ценности.

Заключение

На основании сказанного выше можно сделать вывод, что диссертация Жданова Дмитрия Дмитриевича «Роль эндонуклеазы EndoG в регуляции альтернативного сплайсинга пре-мРНК апоптотических белков» представляет

собой законченное квалификационное научное исследование, выполненное на актуальную научную тему, в ходе которого получены новые данные, имеющие существенное научное и практическое значение для биохимии и молекулярной биологии и полностью соответствует 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».

Заведующий отделом клеточной биологии, заведующий лабораторией генной инженерии, доцент, доктор биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического агентства»


Лазарев Василий Николаевич

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального Медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России)

Адрес: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а

Тел: +7 (499) 255-28-46

Электронный адрес: lazarev@rcpcm.org

Подпись д.б.н., доцента Лазарева В.Н. заверяю

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

Кандидат биологических наук


Кострюкова Елена Сергеевна

17.02.2020

