



ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук  
(ИМБ РАН)

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,  
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: [isinfo@eimb.ru](mailto:isinfo@eimb.ru)  
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

29.05.2015 № 12312 - 2171

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

«УТВЕРЖДАЮ»

Замдиректора  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной биологии  
им. В.А. Энгельгардта  
Российской академии наук  
д.б.н. В.Л. Карпов  
«29» мая 2015 г



ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию **Переверзева Антона Петровича** «Методы анализа процессинга и деградации мРНК с помощью флуоресцентных белков», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – Молекулярная биология.

Процессинг и деградация мРНК вовлечены в регулирование экспрессии генов и поэтому сами подвержены сложному механизму регулирования. Нонсенс-зависимая деградация (NMD) мРНК является консервативным механизмом разрушения транскриптов с преждевременными стоп-кодонами. NMD устраняет аберрантные мРНК, возникающие, в частности, в результате мутаций и альтернативного сплайсинга. Главной функцией NMD является недопущение синтеза укороченных с С-конца и потенциально токсичных для клеток белков. Кроме того, мишенями этого процесса являются нормальные эндогенные транскрипты, которые несут стоп-кодоны, которые распознаются как преждевременные.

Активность NMD регулируется под действием различных механизмов, включая специфические микроРНК и концентрацию кальция. Таким образом, NMD функционирует как механизм регуляции экспрессии множества генов. Регуляция активности NMD играет важную роль в нейрогенезе и развитии мозга. Изменения альтернативного сплайсинга и NMD вовлечены в патогенез ряда заболеваний у человека.



Автор диссертационной работы отмечает, что дальнейшее изучение роли NMD и альтернативного сплайсинга требует разработки новых «инструментов», а именно эффективных репортерных систем, позволяющих количественно оценивать динамику изменений активности NMD и паттернов альтернативного сплайсинга на уровне отдельных клеток.

Диссертационная работа А.П. Переверзева посвящена разработке генетически кодируемых инструментов для исследования процессинга и деградации мРНК на уровне отдельных клеток с помощью флуоресцентных белков. Автор отмечает, что репортерные конструкции на основе флуоресцентных белков обладают рядом преимуществ, включая неинвазивность исследования, возможность отслеживать изменения в динамике, возможность отслеживать события на уровне отдельных клеток, а также возможность их применения для высокопроизводительных функциональных скринингов. При этом существующие методики оценки нонсенс-зависимой деградации мРНК и альтернативного сплайсинга не позволяют количественно оценивать эти процессы на уровне отдельных клеток. В свете вышеизложенного можно заключить, что разработка генетически кодируемых инструментов для исследования процессинга и деградации мРНК на уровне отдельных клеток является весьма актуальной научной задачей.

Автором были получены генетически кодируемый репортер pSplPIG и соответствующая контрольная конструкция pCtrlPIG для отслеживания процесса сплайсинга на уровне отдельных клеток. Для этой цели автор диссертации сконструировал репортерные минигены, в которых последовательности, кодирующие дальне-красный флуоресцентный белок Katushka и зеленый флуоресцентный белок TagGFP, дают яркие и хорошо спектрально различимые флуоресцентные сигналы, причем они были функционально соединены с фрагментами эукариотического гена PIG3. При этом один из флуоресцентных белков служил для нормирования уровня экспрессии репортера, а сигнал второго изменялся в зависимости от сплайсинга мРНК. В результате соотношение интенсивностей флуоресцентных TagGFP2 и Katushka позволяло отслеживать процесс сплайсинга на уровне отдельных клеток. В качестве контроля для установления базового уровня соотношения интенсивностей флуоресценции в двух каналах авторы сконструировали контрольную репортерную конструкцию pCtrlPIG, не содержащую интронов и имитирующую транскрипт, претерпевший нормальный сплайсинг.

Полученные данные показали, что миниген претерпевает альтернативный сплайсинг, и представленность транскриптов минигена PIG3 в отдельных клетках НЕК293Т может варьировать от почти 100% нормального транскрипта до почти 100% альтернативного транскрипта, но большая часть клеток характеризуется наличием обоих транскриптов в различных пропорциях. Средний процент альтернативного транскрипта pSplPIG во всей популяции клеток составлял 50%. Этот показатель был подтвержден методом ПЦР. Автор заключил, что полученные результаты



показали возможность отслеживать процессы на уровне мРНК с помощью разработанных репортерных минигенов по флуоресценции репортера на уровне отдельных клеток.

Затем диссертант применил подобный принцип для конструирования репортерных конструкций для измерения активности процесса нонсенс-зависимой деградации мРНК (NMD) на уровне отдельных клеток.

Сначала автор сконструировал генетически кодируемый репортер активности опосредуемой сплайсингом нонсенс-зависимой деградации мРНК pNMD<sup>+</sup> и соответствующую контрольную конструкцию pNMD<sup>-</sup>. Как и в случае репортера pSplPIG, авторы использовали зеленый флуоресцентный белок TagGFP2 и дальне-красный флуоресцентный белок Katushka, при этом TagGFP2 кодируется мРНК, которая является субстратом NMD, а второй флуоресцентный белок Katushka используется для контроля уровня экспрессии и эффективности трансфекции. В этом случае транскрипт являлся мишенью NMD за счет расположения сплайсируемого интрона после стоп-кодона открытой рамки считывания, кодирующей TagGFP2.

Автор протестировал разработанные флуоресцентные репортеры в линии клеток млекопитающих HEK293 методом проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Анализ показал ожидаемое падение зеленой флуоресценции pNMD<sup>+</sup> по сравнению с pNMD<sup>-</sup>, при этом уровень флуоресценции Katushka был примерно одинаковым для обоих образцов. Для оценки правильности сплайсинга репортера активности NMD был проведен ПЦР-анализ. Анализ продемонстрировал присутствие только правильно сплайсированных продуктов в клетках HEK293T после трансфекции. Затем диссертант провел ингибиторный анализ с использованием известных низкомолекулярных ингибиторов NMD и короткой шпилечной РНК против ключевого фактора NMD UPF1 (shUPF1) и наблюдал увеличение интенсивности флуоресценции в зеленом канале для клеток, трансфицированных pNMD<sup>+</sup>, что соответствовало ожидаемому ингибированию активности NMD. Для подтверждения измеренных значений активности NMD автор измерил активность процесса методом количественной ОТ-ПЦР в тех же экспериментальных условиях параллельно анализу флуоресценции. С помощью количественной ПЦР была проведена оценка активности NMD в не обработанных ингибиторами клетках, а также клетках, обработанных ингибитором NMD кофеином и shUPF1.

Затем, следуя разработанной стратегии оценки активности NMD с помощью двух флуоресцентных белков, автор разработал генетически кодируемый репортер активности независимого от сплайсинга NMD. Распад мРНК в этом случае был опосредован длинным 3'НТО гена SMG5 и приводил к падению интенсивности флуоресценции TagGFP2. Чтобы проверить, что наблюдаемое падение сигнала флуоресценции в зеленом канале было обусловлено активностью NMD, автор также провел ингибиторный анализ и подтвердил полученные данные методом



количественной ОТ-ПЦР.

Разработанные конструкции pNMD<sup>+</sup> и pNMD<sup>-</sup> были использованы для измерения активности NMD в различных линиях клеток млекопитающих и выявлены линии клеток с высокой (HEK293T и HeLa) и относительно низкой (MEF и ES) активностью NMD. Диссертант также наблюдал гетерогенность активности NMD в культивируемых до высокой плотности клетках HEK293T. В качестве потенциального объяснения наблюдаемой гетерогенности автор предположил, что наблюдаемый феномен опосредован повышением уровня кальция при контактном ингибировании роста клеток. Однако данное объяснение нуждается в экспериментальной проверке, которая в работе не проведена.

Активность NMD в динамике также исследовалась в экспериментальной модели трансгенных эмбрионов *Xenopus laevis* (данная часть работы проведена Лабораторией молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН). Автор отмечает, что благодаря неинвазивности измерения с помощью флуоресценции динамику активности NMD удалось наблюдать в отдельных эмбрионах в процессе их развития. В трансгенных эмбрионах, несущих репортер pNMD<sup>+</sup>, наблюдался относительно высокий уровень флуоресценции в зеленом канале в начале нейруляции, однако далее наблюдалось прогрессивное уменьшение флуоресценции TagGFP2. Подтверждением того, что сигнал TagGFP2 в эмбрионах *Xenopus* регулируется NMD, служил эксперимент с подавлением ключевого фактора NMD UPF1 антисмысловыми морфолино олигонуклеотидами. Автор указывает, что полученные результаты косвенно противоречат данным о присутствии ингибирующей NMD микроРНК miR-128 в эмбрионах *Xenopus* после стадии 23, исходя из которых, можно ожидать снижение активности NMD в ходе развития. Безусловно, для окончательного вывода о динамике изменения активности NMD в этой экспериментальной модели автору работы следовало бы провести дополнительные эксперименты.

Полученные результаты обладают большой научной значимостью. Разработанные генетически кодируемые инструменты могут быть использованы в фундаментальных научных исследованиях, а также для высокопроизводительного поиска новых ингибиторов NMD и веществ, влияющих на сплайсинг целевых генов.

Диссертационная работа изложена на 103 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, заключения и списка литературы, включающего 171 ссылку. Диссертация содержит 22 рисунка и 3 таблицы.

Материал диссертационной работы изложен последовательно и логично. Исследование проведено на высоком методическом уровне с использованием самых современных молекулярно-биологических методик. Достоверность полученных данных подтверждена значительным количеством контрольных и подтверждающих экспериментов. Сделанные автором выводы



аргументированы. По своему научному уровню и объёму проделанной работы данная диссертация явно превосходит средний уровень кандидатских диссертаций, защищаемых в данной области науки в нашей стране.

По материалам диссертации опубликовано три статьи в рецензируемых зарубежных и российских научных журналах, результаты работы также докладывались на международной научной конференции.

Обзор литературы, включающий ссылки на самые современные источники, полно освещает тематику диссертации. Рассмотрены процессы альтернативного сплайсинга и нонсенс-зависимой деградации мРНК в клетках млекопитающих. Наибольшее внимание автор уделил описанию процесса NMD. Отдельная глава обзора посвящена описанию физиологической роли процесса NMD в норме и при патологиях. Важно отметить, что отдельную главу автор посвятил существующим подходам для исследования процессинга и деградации мРНК, где автор анализирует данные об известных флуоресцентных репортерах альтернативного сплайсинга и NMD и указывает на их недостатки, которые отсутствуют у полученных в ходе работы репортеров. В целом диссертация написана ясно, хорошим языком и неплохо оформлена.

Основные недостатки диссертации все же связаны с ее оформлением.

Зачастую аббревиатуры расшифрованы несвоевременно: EJC расшифрован только при третьем упоминании (литобзор), NMD - со второго упоминания (литобзор), RUST - со второго раза, через 18 страниц после первого упоминания и только по-русски. В списке сокращений (в конце диссертации) и нигде в тексте не расшифрованы по-английски английские аббревиатуры, а даны только русские вольные переводы. В разделе "Результаты" обсуждение начинается с рис. 3.2, а не с 3.1, причем рис. 3.2 расположен через несколько страниц после ссылки на него. Это мешает восприятию материала и вызывает раздражение читателя. Встречаются стилистические недочеты, не украшающие диссертацию. Стр. 4: «Кроме того, как было недавно показано, мишенями этого процесса являются нормальные эндогенные транскрипты, которые несут стоп-кодны, которые распознаются как преждевременные.» Стр. 24: «Напротив, устойчивые к NMD мутации ведут к выработке укороченных цепей  $\beta$ -глобина. Напротив, при мутациях в последнем 3'-экзоне проявляется атипичная доминантная форма  $\beta$ -талассемии...». Сделанные замечания не носят принципиального характера и не могут снизить высокой оценки диссертации.

Поставленные задачи работы соответствуют цели работы. Раздел, посвященный методам исследования, содержит подробное описание методов молекулярной биологии, работы с клеточными линиями, флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Такое описание позволяет при необходимости воспроизвести данные эксперименты. Этот раздел достаточно полно отражает использованные в работе методики.

Результаты работы и выводы соответствуют поставленным задачам. В автореферате достаточно полно отражено содержание, основные результаты и выводы диссертации. Диссертационная работа соответствует заявленной специальности Молекулярная биология – 03.01.03.

Результаты исследования могут быть использованы для научных исследований в различных институтах РАН (например, Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Институт биохимии имени А.Н.Баха РАН), на биологическом факультете Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, а также в других профильных институтах.

Диссертация соответствует требованиям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842, а ее автор, Антон Петрович Переверзев, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «Молекулярная биология».

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре Лаборатории эволюции геномов эукариот Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), протокол № 5 от « 28 » мая 2015 г.

Зав. лабораторией эволюции геномов эукариот  
Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной биологии  
им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук,  
д.б.н.

Крамеров Д.А.

Подпись д.б.н. Крамерова Д.А. заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института молекулярной биологии  
им. В.А.Энгельгардта Российской академии наук,  
к.х.н.



Крицын А.М.

Контактная информация:

ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32. ИМБ РАН

Телефон: 8(499)135-23-11, 8(499)135-11-60; e-mail: [isinfo@eimb.ru](mailto:isinfo@eimb.ru);

официальный сайт: [www.eimb.ru](http://www.eimb.ru)