

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Антона Петровича Переверзева "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.

Диссертационная работа Переверзева А.П. посвящена получению и тестированию новых флуоресцентных репортеров активности процесса нонсенс-зависимой деградации мРНК (NMD). NMD представляет собой один из важных механизмов в экспрессии генов, главной функцией которого является подавление нонсенс-мутаций на пост-транскрипционном уровне. Недавно было показано, что активность NMD регулируется под действием микроРНК и изменения концентрации внутриклеточного кальция, что ставит перед исследователями новые вопросы и позволяет предположить, что NMD функционирует также в качестве процесса регуляции генной экспрессии. Процесс NMD также позволяет объяснить различие в фенотипическом проявлении множества генетических заболеваний. Дальнейшее изучение роли NMD, а также поиск новых ингибиторов или активаторов этого процесса требует разработки новых инструментов для оценки активности NMD, в частности, эффективных репортерных систем, позволяющих оценивать изменение активности процесса на уровне отдельных клеток и в динамике. Следовательно, разработка новых репортеров активности процесса нонсенс-зависимой деградации мРНК безусловно является актуальной задачей.

Диссертационная работа построена по общепринятому плану и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, цели и задачи, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, заключение, список цитированной литературы (171 источник). Работа хорошо иллюстрирована и содержит 22 рисунка и 3 таблицы.

Обзор литературы включает в себя несколько разделов. Первый раздел посвящен описанию процессов альтернативного сплайсинга и нонсенс-зависимой деградации мРНК в клетках млекопитающих. Автор указывает на большую значимость обоих процессов для физиологии клетки. Отдельный акцент автор делает на функциональной связи между процессом альтернативного сплайсинга и NMD. Из анализа литературы автор делает вывод о том, что наряду с транскриптами, содержащими нонсенс-мутации, мишенями процесса NMD являются физиологические транскрипты, и, таким образом, NMD играет роль пост-транскрипционного регулятора экспрессии генов.



Вторая глава посвящена описанию функциональной организации процесса NMD. Рассмотрены основные белковые факторы NMD и их функции. Обобщены современные представления о механизмах распознавания транскриптов в качестве мишеней для NMD. Раздел 1.2.3. посвящен обзору известных механизмов регуляции активности NMD.

Следующая глава обзора посвящена более детальному описанию физиологической роли процесса NMD в норме и при различных заболеваниях. Рассмотрены различные классы мишеней NMD и источники их возникновения. Рассмотрено совместное действие NMD и альтернативного сплайсинга для регуляции экспрессии генов с помощью механизма регулируемого непродуктивного сплайсинга и трансляции. Отдельный раздел посвящен обзору влияния активности NMD на фенотипическое проявления наследственных заболеваний. При этом в ряде случаев активность NMD оказывает благотворное действие, а в других случаях усугубляет фенотипическое проявление заболевания. Автор делает вывод, что усиление или ингибирование активности NMD представляют собой потенциальные стратегии для лечения с широким применением в медицине.

Заключительная глава посвящена существующим подходам для исследования процессинга и деградации мРНК. Автор суммирует данные об описанных в литературе флуоресцентных репортеров альтернативного сплайсинга и NMD и проводит анализ их ограничений и недостатков. Сделан обоснованный вывод о необходимости разработки новых флуоресцентных репортеров, позволяющих количественно оценивать активность процесса нонсенс-зависимой деградации мРНК на уровне отдельных клеток.

В целом, обзор написан хорошим языком, раскрывает описываемое явление с различных сторон.

Раздел «Материалы и методы» написан добросовестно и подробно, детально описаны все стадии экспериментальной работы – создание генно-инженерных конструкций, получение временно трансфицированных клеточных линий, флуоресцентная микроскопия, проточная цитофлуориметрия, вестерн-блоттинг, нокдаун с помощью кшРНК, выделение РНК, получение кДНК и количественная ОТ-ПЦР в реальном времени, обработка клеток различными ингибиторами NMD. Такое описание позволяет при необходимости воспроизвести данные эксперименты.

Результаты, полученные в данной работе, описаны в разделе «Результаты и обсуждение».



В ходе всего исследования авторы изучали возможность применения пары флуоресцентных белков TagGFP2 и Katushka для отслеживания различных аспектов процессинга мРНК. Для исследования процессов на уровне мРНК был применен подход конструирования репортерных минигенов, в которых последовательности, кодирующие флуоресцентные белки, были функционально соединены с фрагментами эукариотических генов, позволяя отслеживать процессинг или деградацию мРНК по флуоресценции репортера. Один из флуоресцентных белков служил для нормирования уровня экспрессии репортера, а сигнал второго изменялся в зависимости от происходящих изменений на уровне мРНК, в результате чего измеряемое соотношение интенсивностей флуоресцентных сигналов в двух каналах флуоресценции позволяло судить об активности того или иного процесса.

Результаты, полученные в данной работе, можно разделить на 2 основные части.

В первой части описано конструирование репортера альтернативного сплайсинга с использованием пары флуоресцентных белков TagGFP2 и Katushka. Получены временно трансфицированные клеточные линии, несущие флуоресцентные репортеры и характеризующиеся различным уровнем флуоресценции в зеленом и красном каналах, который можно количественно измерить с использованием флуоресцентной микроскопии или проточной цитофлуориметрии, и отношение интенсивностей флуоресценции в зеленом и красном каналах можно использовать для оценки соотношения нормального и альтернативного транскриптов. Чтобы прогестировать данный метод, авторы оценивали альтернативный сплайсинг человеческого гена PIG3 (p53-inducible gene 3). Полученные данные показали, что уровень альтернативного сплайсинга минигена PIG3 в отдельных клетках HEK293T может значительно варьировать от почти 100% нормального транскрипта до почти 100% альтернативного транскрипта, но большая часть клеток характеризуется наличием обоих транскриптов в различных пропорциях. Были различимы две популяции клеток HEK293T с примерно 45% и > 95% альтернативного транскрипта. Средний процент альтернативного транскрипта pSp1PIG во всей популяции клеток составлял 50%. Для подтверждения этого показателя независимым методом, авторы провели анализ методом количественной ПЦР.

Показана возможность отслеживать процессы на уровне мРНК с помощью репортерных минигенов, что позволило оценивать процессинг мРНК по флуоресценции репортера на уровне отдельных клеток. Как указывают авторы, белки TagGFP2 и Katushka давали спектрально различимые сигналы, при этом



включение в анализ второго флуоресцентного белка и использование контрольной конструкции для установления базового уровня соотношения интенсивностей флуоресценции в двух каналах позволяло количественно оценить альтернативный сплайсинг на уровне отдельных клеток.

Вторая часть посвящена созданию и тестированию новых репортеров зависимого от сплайсинга и независимого от сплайсинга NMD с использованием пары флуоресцентных белков TagGFP2 и Katushka. Векторы кодировали флуоресцентные белки TagGFP2 и Katushka под контролем двух идентичных промоторов. Транскрипт, кодирующий зеленый флуоресцентный белок TagGFP2, был мишенью для зависимого от сплайсинга или не зависимого от сплайсинга NMD. Транскрипт, кодирующий дальне-красный флуоресцентный белок Katushka, служил в качестве контроля для общего уровня экспрессии репортера. Были сконструированы контрольные репортерные векторы, в которых транскрипт, кодирующий зеленый флуоресцентный белок TagGFP2, не был субстратом для NMD. С использованием методики временных трансфекций клеток млекопитающих в работе показано, что флуоресцентные сигналы могут быть количественно измерены с помощью стандартных методов. Трансфекция клеток с использованием контрольной репортерной конструкции pNMD- или pNMD-(i-) обеспечивает базовое отношение сигналов флуоресценции в зеленом/красном каналах, которое является характеристикой, присущей каждой конкретной биологической модели или набору параметров измерения. Падение отношения сигналов флуоресценции в зеленом/красном каналах в клетках, трансфицированных репортерной конструкцией pNMD+ или pNMD+(i-), соответствует снижению уровня транскрипта, кодирующего зеленый флуоресцентный белок TagGFP2, под действием NMD. Таким образом, разницу между отношениями сигналов флуоресценции, можно использовать для прямого измерения активности NMD в исследуемой биологической модели.

Репортерная система была протестирована с использованием известных низкомолекулярных ингибиторов NMD вортманнина, кофеина, циклогексимида и нокаута ключевого фактора NMD UPF1 под действием специфической короткой шпилечной РНК (кшРНК). Для оценки ожидаемой дестабилизации кодирующего TagGFP2 транскрипта, являющегося мишенью NMD, в работе использовали ингибитор транскрипции актиномицин Д.

После проверки работоспособности репортерных конструкций в линии клеток HEK293T конструкции pNMD+ и pNMD- использовали для сравнения активности NMD в различных клетках млекопитающих. Для сплайсинг-зависимого NMD показана высокая активность в культурах клеток человека HEK293T и HeLa Kyoto,



и существенно сниженная активность в эмбриональных стволовых клетках (ES) и эмбриональных фибробластах (MEF) мыши.

В некоторых условиях авторам удалось наблюдать отчетливую гетерогенность активности NMD в клетках одной популяции, культивируемых в одной чашке. Этот эффект наблюдался для клеток, культивируемых до высокой плотности, поэтому авторы предположили, что снижение активности NMD можно объяснить механизмом клеточного стресса в областях с высокой плотностью клеток, другим потенциальным объяснением, по мнению авторов, является повышение уровня кальция при контактном ингибировании роста клеток. Авторы отмечают, что указанную гетерогенность было невозможно обнаружить с использованием классических методов измерения активности NMD или известных репортерных конструкций.

На примере трансгенных шпорцевых лягушек *Xenopus laevis* в работе показана возможность применения разработанного репортера зависящего от сплайсинга NMD для неинвазивной оценки активности NMD в ходе эмбрионального развития.

Далее я привожу список замеченных недостатков данной работы:

- 1) Более 90% использованных в работе статей опубликованы до 2010 года, тогда как по тематике NMD количество публикаций растет каждый год. Автору необходимо было более тщательно осветить последние открытия в указанной области.
- 2) Литературный обзор следовало бы расширить, чтобы он по объему был сравним с экспериментальной частью диссертации.
- 3) Недочеты в оформлении: названия генов необходимо указывать наклонным шрифтом, последовательности нуклеотидов – заглавными буквами. Не совсем удачным является соседство англоязычных и русскоязычных аббревиатур: так, часто в одном предложении встречаются ПСК и NMD.
- 4) Не проведена оценка статистической достоверности различий активности NMD, измеренных для различных образцов (в разных клеточных линиях или при воздействии ингибиторов);
- 5) Желательно было бы включить в анализ большее число клеточных линий с помощью разработанного репортера.

Однако в целом диссертация оставляет прекрасное впечатление цельной высококвалифицированной работы.

Автореферат диссертации отражает содержание работы. Основные материалы диссертации опубликованы в рецензируемых российских и

зарубежных научных журналах и представлены на научных конференциях. Сделанные автором выводы изложены лаконично, убедительно и не вызывают сомнений.

В целом, диссертационная работа А.П. Переверзева является оригинальным исследованием, выполненным на хорошем экспериментальном уровне. Результаты исследования могут быть использованы для научных исследований в различных институтах РАН (например, Институт биоорганической химии, Институт молекулярной биологии, Институт биологии гена). Диссертация соответствует критериям, 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.

Официальный оппонент:

заместитель директора по научной работе  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения науки Института биологии гена  
Российской академии наук (ИБГ РАН),  
заведующий лабораторией регуляции  
экспрессии генов в развитии ИБГ РАН,  
доктор биологических наук,

Ю.В.Шидловский



Контактная информация:

д.б.н. Шидловский Юлий Валерьевич  
119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5  
Тел. (499)135-60-89. E-mail: yul@genebiology.ru