

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук С.А. Демакова на диссертационную работу Дольского Александра Алексеевича «Некодирующие РНК в патогенезе заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Актуальность темы диссертационной работы.

В популяции человека достаточно высока частота встречаемости наследственных заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, связанных с увеличением количества tandemно расположенных триплетов CGG в 5'-нетранслируемой области (5'-НТО) мРНК гена *fragile X mental retardation 1* (*FMR1*) человека. Это приводит к синдромам, вызывающим первичную овариальную недостаточность, атаксию и тремор, а также развитие умственной отсталости. Детали механизмов развития проявлений этих заболеваний остаются еще во многом неизвестными. В случае полной мутации этого гена причиной заболевания является отсутствие его активности. Однако, в случае премутации механизмы патогенеза до конца не известны. Поскольку развитие патологий у носителей премутантного аллеля гена *FMR1* напрямую не коррелирует с длиной CGG повторов, предполагают, что в нарушении регуляции активности этого гена могут участвовать некодирующие РНК, в частности микроРНК. Однако, к настоящему времени данных о роли микроРНК в патогенезе этих заболеваний не много. В связи с этим поставленная в диссертационной работе А.А. Дольского задача - исследование уровня экспрессии микроРНК, комплементарных мРНК гена *FMR1*, и их роли в регуляции активности этого гена, несомненно, является актуальной.

Научная значимость и новизна работы, на мой взгляд, очевидны:

1. А.А. Дольским получены уникальные данные об уровнях экспрессии семи изученных микроРНК в широкой выборке клеточных культур человека с разной активностью гена *FMR1*, что позволило провести детальный анализ корреляции уровня активности этого гена в зависимости от представленности микроРНК. 2. В работе создана модельная система на основе плазмидной ДНК, что позволило впервые экспериментально подтвердить взаимодействие трех микроРНК (hsa-miR-

25- 3p, hsa-miR-148a-3p и hsa-miR-139-5p) с 3'-областью мРНК гена *FMR1*. 3. На модели FXTAS в головном мозге мышей соискателем получены новые данные об уровне экспрессии hsa-miR-182-5p, hsa-miR-25-3, hsa-miR-139-5p. Впервые показано, что miR-139-5p является негативным регулятором активности гена *fmr1* в клеточных линиях В-лимфоцитов и в головном мозге мышей. В дальнейшем данная микроРНК может быть использована в качестве возможного раннего диагностического маркера развития заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, которые напрямую не коррелируют с размером CGG повтора у пациентов с премутантным аллелем гена *FMR1*; 4. Впервые охарактеризована микроРНК (hsa-miR-182-5p) с вероятной ролью в развитии синдрома ломкой X-хромосомы при отсутствии мРНК *FMR1* и белка FMRP.

Выполненное А.А. Дольским исследование, без сомнения, **имеет теоретическую значимость**. В результате работы получены новые данные об участии микроРНК в регуляции активности гена *FMR1* и развитии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой с использованием двух модельных клеточных объектов (клеточных линий человека, а также лабораторных животных), а также созданной плазмидной конструкции, которая позволяет проводить анализ взаимодействия микроРНК с целевой последовательностью мРНК гена *FMR1*.

Практическое значение работы, на мой взгляд, заключается в возможности использования результатов для прогнозирования течения заболеваний у пациентов с премутацией гена *FMR1*. Полученные результаты представляют несомненный интерес и могут быть полезны исследователям, работающим в области изучения роли микроРНК.

Достоверность представленных в диссертации результатов не вызывает сомнения и обеспечивается: 1. адекватным выбором объектов исследований; 2. использованием современного оборудования и широкого спектра взаимодополняющих методов молекулярной биологии, адекватных цели и задачам работы; 3. значительным объемом полученных экспериментальных данных и их тщательным анализом.

Все эксперименты, проведенные автором, имели адекватные контроли и корректную статистическую обработку. Выводы и положения, выносимые на защиту, корректны и в полной мере отражают полученные результаты.

Основные результаты диссертационной работы получены лично автором. Материалы диссертационного исследования представлены на 6 научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 5 научных публикаций в журналах из перечня ВАК.

Характеристика диссертации. Материалы работы изложены на 141 машинописной странице по традиционному плану, включающему разделы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и Методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и Список цитированной литературы. Диссертация содержит 11 рисунков, 7 таблиц и 4 приложения. Список цитируемой литературы включает 233 источника.

Введение написано в соответствии с требованиями ВАК РФ. В нем представлены все разделы, необходимые для общей характеристики работы. Четко обоснованы актуальность темы исследования, степень ее разработанности в мировой науке, сформулированы цель и основные задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость исследования и приведены основные методы исследования. Также в этом разделе в виде положений, выносимых на защиту, сформулированы основные выводы работы, которые подтверждены списком публикаций автора из 5 статей, опубликованных в российских и высокорейтинговых зарубежных научных журналах, показана апробация результатов и личный вклад автора. Обращает на себя внимание, что все работы посвящены одной теме и логично дополняют друг друга,

Обзор литературы (Глава 1) представлен на 27 страницах достаточно полной и хорошо систематизированной подборкой сведений по теме диссертации. Автор подробно анализирует современные данные о клинической картине заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Рассмотрены известные к настоящему времени сведения о возможных механизмах их патогенеза. В отдельном разделе детально представлены основные исследования, касающиеся предполагаемой роли микроРНК в развитии заболеваний. Приведены

классификация некодирующих РНК и этапы биогенеза микроРНК, а также рассмотрены актуальные данные о участии микроРНК в развитии и функционировании головного мозга. Обзор завершается кратким заключением, в котором рассмотрены оставшиеся нерешенными вопросы и определены основные направления исследований работы. В целом, обзор литературы дает достаточно полное представление об области исследований, которых касается диссертация, позволяя критически анализировать полученные автором результаты и их обсуждение.

В разделе "**Материалы и методы**" (Глава 2) на 25 страницах дается описание экспериментальных процедур, использованных в ходе выполнения работы. Текст главы дает исчерпывающие представления об использованных молекулярных, генно-инженерных и иммунохимических методах исследования, описание методов составлено достаточно подробно и в соответствии с принятыми правилами. Приведено подробное описание используемых модельных систем: клеточных линий и модельных животных.

Следует отметить широкий спектр методов исследования и примененных подходов, что свидетельствует о высокой квалификации автора. Комплекс примененных методов и подходов адекватен для решения задач, сформулированных в диссертационной работе.

В **Главе 3 (Результаты и обсуждение)** автор логично и содержательно описывает проведенную работу, и приводит сопоставление полученных результатов с ранее опубликованными данными. Глава состоит из шести частей, связанных между собой тематически. В **первой части** описан выбор микроРНК, взаимодействующих с 3'-НТО мРНК гена *FMR1*. Во **второй части** представлены результаты исследования активности гена *FMR1* в клеточных культурах В-лимфоцитов. Дана детальная характеристика выбранных 10 клеточных линий. Определены уровни экспрессии мРНК гена *FMR1* и белка *FMRP* в этих линиях, а также длины CGG повторов и наличие метилирования промоторной области гена *FMR1*. Показано, что в линиях, которые обладают полной мутацией гена *FMR1* с присутствием метилирования промоторной области – мРНК и белок *FMRP* отсутствуют, что является характерным признаком этого варианта гена у

пациентов. В результате анализа полученных данных, сделан вывод о том, что уровень экспрессии мРНК и белка FMRP напрямую не связан с нормой и премутацией гена FMR1 в постоянных клеточных линиях В-лимфоцитов. Обоснованы представления о необходимости изучения активности этого гена в зависимости от экспрессии микроРНК. В **третьей части** главы представлены данные об уровнях экспрессии семи микроРНК в клеточных линиях В-лимфоцитов, разделенных автором на пять групп по степени представленности мРНК и белка гена *FMR1*. В **четвертой части** приведены результаты взаимодействия микроРНК с 3'-НТО мРНК гена *FMR1*. Подробно описана схема получения и использования созданной плазмидной конструкции в клеточной культуре HEK293, полученной из почек эмбриона человека. В конце этой части приведен детальный сравнительный анализ полученных автором данных уровней экспрессии выбранных микроРНК и их взаимодействия с мРНК гена *FMR1* в пяти группах клеточных линиях В-лимфоцитов. В **пятой части** приведены результаты сравнительного анализа уровня экспрессии мРНК гена *fmr1* и белка Fmrp в образцах из головного мозга мышей на модели атаксии и тремора FXTAS, взятых у самок, гомозиготных и гетерозиготных по премутантному аллелю данного гена, и у самцов с этим же аллелем, на ранних и поздних возрастных стадиях развития. В **шестой части** описаны полученные автором экспериментальные данные о паттернах экспрессии микроРНК в головном мозге мышей и проведен их детальный сравнительный анализ с данными, полученными ранее. В **заключении** к главе «Результаты и обсуждение» суммируются основные результаты, полученные в ходе исследований, и возможные пути их дальнейшего развития.

В целом, представленная работа изложена доступно и логично. Иллюстративный материал в полной мере дополняет изложение обширных экспериментальных данных и является их составной частью. Выводы диссертации четко сформулированы и надежно обоснованы экспериментальным материалом. Автореферат соответствует содержанию диссертации, а в публикациях автора отражены практически все результаты.

Принципиальных замечаний к содержанию диссертационной работы нет. При чтении работы, тем не менее, появился **ряд незначительных замечаний:**

1. Нигде не приведено полное название гена *FMR1 - fragile X mental retardation* 1.

2. В разделе «Обзор литературы» при характеристике гена *FMR1* было бы полезно привести схему его молекулярно-генетической организации с указанием основных функциональных элементов. Также было бы полезно в данный раздел включить описание существующих моделей нарушений, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, выполненных на модельных животных, в частности на мышах, поскольку они являются объектом исследования данной диссертации.

3. В разделе «Результаты и обсуждение» хотелось бы увидеть примеры вестерн-блот изображений, которые были использованы для оценки представленности белков FMRP (*Fmrp*) и GAPDH (*Gapdh*) в образцах.

4. Несмотря на то, что в целом содержание работы представлено полно и логично, текст содержит довольно много технических недочетов и жаргонизмов. Например: «первичная последовательность пептидов (стр.25), «первичная последовательность мРНК» (стр.32), «...паралогами FXR1P и FXR2P, закодированными в аутосомах» (стр.35), «некодирующие РНК размером ... пар нуклеотидов» (стр.26); В ссылках на литературные источники не нужно указывать инициалы имен авторов; Пояснения в таблицах принято помещать в примечания внизу таблиц, но не в составе их названий. В таблицах 3, 5 и 7 не приведены стандартные отклонения от средних значений для уровней представленности мРНК, белков и микроРНК.

Приведенные замечания носят, в основном, рекомендательный характер и ни в коей мере не снижают моей высокой оценки диссертационной работы А.А. Дольского.


Заключение.

Диссертационная работа Дольского Александра Алексеевича «Некодирующие РНК в патогенезе заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук 03.01.03 (1.5.3) - "молекулярная биология", является законченной научно-квалификационной работой, в которой автором с применением современных молекулярно-биологических методов и оригинальных экспериментальных

подходов были получены новые данные о роли микроРНК в регуляции активности гена *FMRI*. Эти данные вносят существенный научный вклад в область знаний о механизмах развития наследственных заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой, что, безусловно, будет полезным уже в ближайшем будущем для персонализированной медицины и биотехнологии. По актуальности, новизне, научной и практической значимости, а также методологическому и методическому уровню полученных результатов рассматриваемая диссертационная работа полностью соответствует критериям п. 9-14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор, Дольский Александр Алексеевич, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 (1.5.3) – «молекулярная биология»

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН)

 Сергей Анатольевич Демаков

Юридический адрес: 630090, г. Новосибирск, просп. акад. Лаврентьева, 8/2
Фактический адрес: 630090, г. Новосибирск, Морской проспект, д.31/8

Телефон: +7 (383) 363-90-42

Электронная почта: demakov@mcb.nsc.ru

Подпись доктора биологических наук

Сергея Анатольевича Демакова «ЗАВЕРЯЮ»

05 мая 2022 г.

Специально заверен
