

ОТЗЫВ

официального оппонента Лябина Дмитрия Николаевича
на диссертационную работу Маслаковой Айтсаны Алексеевны на тему
«Структурно-функциональный анализ транскриптов гена *SERPINA1*: поиск
альтернативных продуктов трансляции - изоформ и С-концевых пептидов альфа1-
антитрипсина человека», представленную на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Актуальность диссертационного исследования

Объект исследования диссертационной работы Айтсаны Алексеевны – альфа1-антитрипсин, кодируемый геном *SERPINA1* – является одним из самых изучаемых белков, который помимо своей основной антипротеолитической функции обладает и иными, не менее важными активностями: противовоспалительной и иммунорегуляторной, антиапоптотической, противовирусной и шапероноподобной. Альфа1-антитрипсин вовлечен и в универсальные механизмы канцерогенеза, но, возможно, некоторые его функции, до сих пор остаются неизвестными. Во многом разнообразие функций альфа1-антитрипсина может быть обусловлено наличием внутриклеточных изоформ альфа1-антитрипсина и его С-концевых пептидов. Однако о механизмах их появления в клетках известно было крайне мало. В связи с этим, тема диссертационной работы А.А. Маслаковой «Структурно-функциональный анализ транскриптов гена *SERPINA1*: поиск альтернативных продуктов трансляции - изоформ и С-концевых пептидов альфа1-антитрипсина человека» обладает несомненной актуальностью и представляет большой интерес для понимания особенностей экспрессии гена *SERPINA1*, повышающих разнообразие соответствующих белковых продуктов. Данное исследование представляет интерес не только для фундаментальной науки, но и для решения прикладных задач, таких, как разработка современных терапевтических средств для лечения заболеваний, связанных как с функциями альфа1-антитрипсина, так и имеющих более сложные механизмы развития.

Структура работы

Материал диссертации изложен на 167 страницах машинописного текста, который включает в себя 43 рисунка и 6 таблиц. Диссертационная работа написана в соответствии с требованиями к оформлению работ и состоит из

разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и их обсуждение» (с приложением), «Заключение», «Выводы», «Список литературы», который содержит 457 ссылок.

Научная новизна и практическая значимость работы

Диссертационная работа Айтсаны Алексеевны Маслаковой является первым детальным исследованием экспрессии гена *SERPINA1* на уровне трансляции, а именно возможности синтеза альтернативных изо(протео)форм альфа1-антитрипсина. Автором впервые обнаружены короткие транскрипты *SERPINA1*, содержащие экзон 5 и не содержащие главную рамку считывания. Кроме того, определена первичная структура 5'-концов длинных и коротких транскриптов, а также показано, что транскрипты в основном полиаденилированы по проксимальному альтернативному сайту полиаденилирования. Установлено, что с длинных транскриптов *SERPINA1* независимо от структуры 5'-НТО с альтернативного внутреннего старт-кодона транслируется также внутриклеточный, негликозилированный альфа1-антитрипсин, который детектируется в ядерных спеклах. Впервые показано, что с коротких гепато-специфических транскриптов транслируется четыре С-концевые протеоформы альфа1-антитрипсина, две из которых - с альтернативных изоформных коротких ОРС в экзоне 5, секретируются, а также накапливаются в ядрах клеток.

Проведенное исследование позволяет понять механизмы повышения биологического разнообразия продуктов гена *SERPINA1*. Результаты, полученные в данной работе, могут иметь важное практическое значение, поскольку открывают новые возможности для более глубокого понимания развития заболеваний, в частности понимания взаимосвязи экспрессии *SERPINA1* и канцерогенеза, а также мутаций в гене *SERPINA1* и риска развития патологий.

Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов

Положения, сформулированные в диссертации Айтсаны Алексеевны Маслаковой, основаны на большом объеме фактического материала. Выводы обоснованы совокупностью приведенных данных. Статистическая обработка экспериментальных данных адекватна, их достоверность не вызывает сомнений.

Оценка содержания диссертационной работы и ее завершенности

Диссертационная работа Айтсаны Алексеевны Маслаковой по своей структуре и качеству изложения материала соответствует имеющимся стандартам. Во «Введении» автор формулирует цели и задачи работы. Здесь же обосновывается ее актуальность, теоретическая и практическая значимость. Обзор литературы целиком и полностью посвящен всем возможным аспектам функционирования альфа1-антитрипсина, его синтеза и его роли в тех или иных патологических состояниях. Обзор можно назвать исчерпывающим и сверхинформативным. Иллюстративный материал в немалой степени способствует пониманию описываемого материала. Язык изложения в целом понятен. Но иногда автор не вполне оправдано употребляет англицизмы, а местами хочет уместить много мыслей в одно предложение, что несколько затрудняет чтение текста. Стоит отметить малое количество опечаток и ошибок в тексте этой части работы, что, впрочем, относится и ко всему тексту в целом.

Раздел «Материалы и методы исследования» содержит 13 подразделов с подробным описанием примененных автором методик, которые полностью соответствуют поставленным экспериментальным задачам.

В разделе «Результаты и их обсуждение» автор представляет полученные данные и сопровождает их достаточно развернутым, а местами даже превосходящим целесообразность, обсуждением. В тексте видна увлеченность автора темой исследования, его желание разобраться в результатах эксперимента, а также наметить пути дальнейшей работы. Необходимо отметить большой объем выполненных экспериментов. Несомненным плюсом работы является наличие раздела «Приложение». Приведённые в этом разделе данные и вспомогательные материалы способствуют доверию результатам основной части диссертации. В разделе «Заключение» диссертант коротко суммирует полученную информацию и подводит итоги исследования. Раздел «Выводы» содержит 6 утверждений, все из которых не вызывают серьезных нареканий.

В целом после прочтения рукописи не остается сомнений в научной значимости диссертационной работы, а также в ее потенциальной пользе для будущих фундаментальных и прикладных исследований.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертационной работы оформлен по стандартной схеме и соответствует установленным требованиям, материал автореферата точно и достоверно отражает результаты проведенных исследований, дает

исчерпывающее представление о содержании диссертации и степени участия автора в исследованиях.

Замечания к диссертационной работе

1. Первое замечание касается изложения материала. Текст местами настолько витиевато написан, что едва улавливается смысл этого текста. Достаточно привести в качестве примера следующее: «...Ниже мы перечислим оба [направления], не нарушая последовательности изложения данных о природе ААТ и его фрагментов в разделе “обзор литературы”, которая является более логически выстроенной, несмотря на то, что хронологически второе из излагаемых направлений определилось раньше». Также следует отметить ощутимое количество ремарок, вносимых в скобках, которые усложняют текст. Помимо этого довольно часто обсуждение результатов «скатывается» в дополнительный обзор литературы. Чувствуется, что автор подошел к тексту творчески, но в совокупности с желанием довести до читателя буквально все свои мысли и рассуждения это привело к некой тяжеловесности текста.

2. Одним из предположений высказанных в диссертации является гипотеза о посттранскрипционном происхождении коротких транскриптов *SERPINA1* (пункт 4.4). Если это так, то не должны ли наряду с короткими транскриптами, содержащими 5 экзон, детектироваться и остальные продукты процессинга исходной мРНК (например, зондом EX2/3). Кроме того, утверждается, что в экспериментах 5'RACE учитывались только кэпированные короткие транскрипты (стр. 95, конец второго абзаца). Это означает, что после образования коротких транскриптов (в результате процессинга основного транскрипта), они должны каким-то образом кэпироваться в цитоплазме, что является очень маловероятным событием.

3. Возникает вопрос относительно рисунка 4.3. (нозерн-блот). На обеих панелях можно видеть отчетливую полосу, соответствующую РНК длиной около 5000 н. Чему, по мнению автора, соответствует эта полоса? Кроме того, на мой взгляд, для проведения нозерн-блота более безопасно использовать ДНК-зонды, а не довольно протяженные РНК-зонды, которые в некоторых условиях могут деградировать, а образующиеся фрагменты давать неспецифическую гибридизацию.

4. Вызывает некоторые сомнения часть работы 4.2.4 (Антисмысловый транскрипт - возможный положительный регулятор синтеза ААТ. Содержание ААТ в секретах клеточных линий). Если сама идея экспрессии антисмысловых РНК весьма интересна и помогает понять различия между данными нозерн-блота и

ПЦР в реальном времени, то вывод о том, что «антисмысловой транскрипт может служить положительным регулятором в конечном итоге синтеза ААТ» для меня не очевиден. Приведены данные о корреляции количества коротких транскриптов *SERPINA1* с количеством секретируемого ААТ, но вывод делается об антисмысловых РНК. Не нужно ли было искать корреляцию количества ААТ с количеством антисмысловых РНК в таком случае. Хочется получить более доходчивое объяснение. Справедливости ради нужно отметить, что предположения автора, сделанные по результатам этой части работы не являются положениями выносимыми на защиту.

5. На рисунке 4.6.Г не приведены данные для экспрессии транскрипта, полиаденилированного по сайту АРА1, из-за чего тезис автора «Уровень экспрессии участков, выбранных для АРА1 и АРА2, практически совпадает, следовательно, транскриптов, полиаденилированных по АРА1, крайне мало.» не имеет подтверждения.

6. Относительно экспериментов 5'- и 3'-RACE есть вопрос о секвенировании продуктов реакции. Было ли проведено тотальное секвенирование продуктов реакции с помощью методов высокопроизводительного секвенирования? Это бы дало исчерпывающую картину 5' и 3' концов мРНК, а не заставило довольствоваться единичными секвенированиями получаемых фрагментов. Из описания методов, ко всему прочему, не понятно секвенировалась ли фрагменты ДНК из экспериментов RACE сразу после синтеза (и возможно выделения из геля) или дополнительно клонировались в какой либо вектор, а потом секвенировались некоторые клоны.

7. К экспериментам по изучению трансляции изоформ длинной мРНК *SERPINA1* напрашиваются эксперименты в бесклеточной системе трансляции с использованием радиоактивной метки (например, лейцина C^{14}). Это бы позволило более точно количественно оценить соотношения продуктов трансляции, избежать влияния довесков РНК (GFP и фрагмента синтезируемого с промотора CMV) на трансляцию, исключить артефакты связанные с эффективностью трансфекции клеток плазмидными конструкциями.

8. Для чего изучалась возможная ассоциация изоформы ААТ с РНК. Кроме того, на рисунке 4.14. заметно, что окраска ядер красителем DAPI (ДНК-специфичный) сильно уменьшилась при обработке РНКазой, что, возможно, намекает на то что была примесь ДНКазы.

9. К экспериментам по трансляции коротких транскриптов мРНК *SERPINA1* было бы не лишним добавить эксперименты с конструкциями с

мутациями в предполагаемых стартовых кодонах, как это было сделано для длинных транскриптов мРНК *SERPINA1*.

10. Весьма интригующим свойством продуктов синтеза коротких OPC мРНК *SERPINA1* p1 и p2 является их способность служить «драйверами секреции химерных продуктов», но предположений по поводу причин такого свойства в тексте нет. Есть только предположения относительно отсутствия указанной способности у более длинных пептидов (p3, p4).

11. На мой взгляд, в конечном варианте манускрипта без серьезного влияния на выводы и достоверность результатов можно было удалить или, по крайней мере, сократить несколько пунктов. В частности, это касается разделов 4.2.4. (Антисмысловой транскрипт - возможный положительный регулятор синтеза ААТ. Содержание ААТ в секретах клеточных линий), 4.4. (Досье *SERPINA1*, извлеченное из данных CAGE и Chip-Seq, выявляет возможный механизм образования коротких транскриптов), 4.5.3 (Альтернативный сайт инициации трансляции *SERPINA1* и размер альтернативной OPC консервативны среди млекопитающих), 4.6.2 (Сочетание 3'-проксимальных альтернативных OPC *SERPINA1* представлено у приматов. икOPC *SERPINA1* - объект текущей эволюции млекопитающих).

12. Можно отметить наличие в работе заметного количества неточных выражений и лингвистических вольностей. Например, заголовок пункта 4.5.2 «Сайт-направленный мутагенез плазмидных конструкций ранжирует внутриклеточную протеоформу в несекреторную изоформу ААТ», выражения «...поликлональных антител, выращенных против ААТ...», «неофункционализация молекулы», «...99 кДа ААТ из секрета «ускорился» до 81 кДа...», «спорадические данные» и т.п.

Такое обилие вопросов к диссертационной работе Айтсаны Алексеевны Маслаковой ни в коем случае не умаляет её научную значимость, поскольку все замечания носят уточняющий характер или диктуются желанием рецензента узнать еще больше о предмете исследования и его будущем.

Заключение

Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.3 – «молекулярная биология», а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном

университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Айтсана Алексеевна Маслакова заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «молекулярная биология».

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на межлабораторном семинаре группы регуляции биосинтеза белка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка Российской академии наук.

Д.б.н., руководитель группы
регуляции биосинтеза белка
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
Институт белка Российской
академии наук
Лябин Дмитрий Николаевич



24 октября 2023 г.

Контактные данные:

тел.: 7(916)8292401, e-mail: lyabin@vega.protres.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация: 1.5.3 – Молекулярная биология

Адрес места работы:

142290, Московская обл. г.Пушино, ул. Институтская, д. 4,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка
Российской академии наук, группа регуляции биосинтеза белка

Тел.: 8(496)7318427; e-mail: lyabin@vega.protres.ru

Подпись сотрудника ИБ РАН
Лябина Дмитрия Николаевича
удостоверяю:

ПОДПИСЬ
УДОСТОВЕРЯЮ
ЗАВ. КАНЦЕЛЯРИЕЙ
ИБ РАН
АКСЕНОВА Г.Н.



24.10