

**ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
доктора химических наук Первушина Дмитрия Давидовича
на тему: «Альтернативный сплайсинг и дальние взаимодействия в
структуре эукариотических РНК»
по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.**

Понимание многочисленных функций, которые РНК выполняют в живых клетках, в решающей степени зависит от знания их трехмерной структуры. В то время как для наиболее важных классов некодирующих РНК, такие как рРНК и тРНК, трехмерные структуры в достаточной мере изучены, вопрос о наличии и функциях таких структур у кодирующих РНК до сих пор остается открытым. Хорошо известно, что у прокариот структура РНК участвует в регуляции трансляции и терминации транскрипции, однако по сравнению с ними эукариотические РНК устроены намного сложнее, поскольку они подвергаются сплайсингу и на несколько порядков превосходят их по длине. Последнее обстоятельство не позволяет применять существующие методы моделирования структуры к эукариотическим РНК, как вследствие недостаточной мощности вычислительных методов, так и из-за систематических ошибок моделей, которые имеют тенденцию неверно предсказывать дальние взаимодействия. Однако для понимания функции знания детальной трехмерной структуры эукариотических РНК на атомном уровне и не требуется, поскольку в регуляции клеточных процессов в основном участвуют “скелетные” элементы вторичной структуры – протяженные двухцепочечные участки, составляющие основу трехмерной структуры. Особенный интерес представляет то, какую роль этот “скелет” играет в регуляции сплайсинга.

Диссертационная работа Первушина Дмитрия Давидовича посвящена изучению влияния вторичной структуры эукариотических РНК на альтернативный сплайсинг. В своей работе автор использовал комплексный подход, сочетающий биоинформатические предсказания дальних взаимодействий с классическим методом двойных мутантов и воздействием

на структуру РНК антисенс олигонуклеотидами для демонстрации их биологической функции. Биоинформатические методы включают в себя термодинамическое моделирование, методы сравнительной геномики, анализ данных секвенирования РНК и данных конформационного секвенирования РНК *in situ*. Экспериментальные методы включают в себя клонирование конструкций с использованием минигенов, сайт-направленный мутагенез, количественное исследование сплайс-изоформ при помощи ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР-РВ в ответ на пертурбации уровней экспрессии некоторых белков и блокировку РНК структур антисенс олигонуклеотидами.

Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, выводов, заключения и списка цитируемой литературы. Первая глава представляет из себя обзор литературы, в котором обсуждаются альтернативный сплайсинг и методы экспериментального определения и вычислительного предсказания вторичной структуры РНК. Затем во второй главе сжато перечисляются общие для всех разделов материалы и методы. В третьей главе представлены два метода предсказания дальних взаимодействий в структуре РНК, которые автор называет “сначала фолдинг, потом выравнивание” и “сначала выравнивание, потом фолдинг”, и которые являются двумя предельными реализациями задачи одновременного выравнивания последовательностей и предсказания термодинамически оптимальной структуры. Затем один из этих методов применяется к предсказанию консервативных РНК-структур в интронах генов человека и описываются характерные свойства этих структур. В четвертой главе, автор соотносит полученные предсказания структуры РНК с данными конформационного секвенирования РНК *in situ* и, на основании сделанных наблюдений, распространяет метод предсказания дальних взаимодействий на неконсервативные области. Пятая глава посвящена экспериментальной валидации РНК-структур, влияющих на сплайсинг. В ней рассматриваются минигенные модели, а также используется блокировка структур РНК антисенс олигонуклеотидами. Показывается влияние дальних взаимодействий на основные типы событий альтернативного сплайсинга (и даже

полиаденилирование) в генах дрозофилы и человека. Наиболее сложным и интересным случаем является регуляция сплайсинга в гене ATE1 человека двумя группами структур, одна из которых содержит дальние взаимодействия на расстоянии 30000 нуклеотидов. Показывается, что котранскрипционное сворачивание влияет на дальние взаимодействия и определяет соотношение сплайс-изоформ этого гена. В шестой главе обсуждается так называемый непродуктивный сплайсинг, т.е. система регулируемого сопряжения альтернативного сплайсинга и нонсенс-опосредованного распада, которая у эукариот служит для посттранскрипционной регуляции экспрессии. Автор обнаруживает множество ауто- и кросс-регуляторных сетей непродуктивного сплайсинга и, в частности, тканеспецифические события, а также регуляцию непродуктивного сплайсинга в семействе BET-белков через дальние взаимодействия в структуре РНК. Некоторые из этих регуляторных событий подтверждаются экспериментально.

Заявленные цели исследования сформулированы следующим образом:

1. Разработать методы предсказания дальних взаимодействий в структуре РНК, реализующие принципы «сначала выравнивание, потом фолдинг» и «сначала фолдинг, потом выравнивание»;
2. Описать положение предсказанных РНК-структур относительно цис-регуляторных элементов в пре-мРНК и исследовать отклик транскрипта на замедление элонгации транскрипции в зависимости от структуры РНК;
3. Сопоставить предсказания РНК-структур с данными конформационного секвенирования РНК *in situ*;
4. Разработать основанный на данных конформационного секвенирования РНК *in situ* метод предсказания структуры за пределами консервативных областей;

5. Экспериментально валидировать влияние предсказанных РНК структур на основные типы событий альтернативного сплайсинга;
6. Разработать методы предсказания ауто- и кросс-регуляторного непродуктивного сплайсинга по транскриптомным данным;
7. Исследовать и экспериментально валидировать роль вторичной структуры РНК в регуляции непродуктивного сплайсинга.

Действительно, автор разрабатывает два взаимодополняющих метода предсказания дальних взаимодействий в структуре РНК, один из которых находит структуры в множественных выравниваниях родственных последовательностей, а другой, наоборот, находит выравнивание, соответствующее общей вторичной структуре. Он описывает множество предсказанных структур РНК и сравнивает изменение соотношения сплайс-изоформ в структурированных и неструктурированных пре-мРНК при замедлении элонгации транскрипции. Приводится метод предсказания вторичной структуры РНК на основании данных конформационного секвенирования РНК *in situ*. Экспериментально показывается влияние структуры РНК в десяти генах (3 гена дрозофилы и 7 генов человека) на основные типы альтернативный сплайсинга – пропуск экзонов, удержание интронов, выбор альтернативных 5'- и 3'-сплайс сайтов, взаимоисключающих и терминальных экзонов. По данным секвенирования РНК предсказываются неизвестные ранее события непродуктивного сплайсинга, в том числе регулируемые РНК-структурами, два из которых подтверждаются экспериментально. Таким образом, заявленные цели исследования полностью выполнены.

Несмотря на высокий уровень выполненной работы, по диссертации имеются следующие вопросы и замечания:

1. В разделе 3.3 не уточняется о консервативности внутри каких филогенетических групп идет речь. И почему нельзя сначала

найти все пары комплементарных участков, а потом отобрать те из них, которые удовлетворяют требованию консервативности?

2. На стр. 78 в 3.3.2 говорится о предельном расстоянии 10000 нт между консервативными интронными фрагментами, но не понятно почему накладывается именно это ограничение. Особенно в свете того, что в дальнейшем автор экспериментально показывает существование функции у дальних взаимодействий на расстоянии 30000 нт.
3. На стр 108 приводится иллюстрация протокола конформационного секвенирования РНК *in situ*. Не совсем понятно причем тут структура РНК, если сшивание происходит через РНК-связывающие белки?
4. Автор не объясняет почему для разных генов использовалась разная стратегия мутагенеза: в некоторых случаях вводились точечные мутации, а в других производился разворот последовательности?
5. Пропуск терминального экзона в гене *Nmnat* регулируется структурой, расположенной в экзоне и интроне и регулирующей в том числе альтернативное полиаденилирование. Рассматривалась ли такая организация регулирующих структур в генах млекопитающих?
6. Чем объясняется различная нумерация комплементарных областей в разных генах? Например, в гене *CASK* рассматриваются участки r3 и r4, а затем в гене *ATE1* нумерация начинается с r1?

Сделанные замечания в целом не снижают общей положительной оценки выполненного диссертационного исследования. Полученные в ходе выполнения диссертации результаты изложены в 33 научных статьях, опубликованных в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.014.2, и одном патенте на

изобретение. Результаты работы и значимые выводы исследования также были представлены и обсуждены на множестве ведущих отечественных и международных научных конференций и конгрессов.

На основе изучения представленной диссертационной работы заключаю, что диссертация Первушина Дмитрия Давидовича «Альтернативный сплайсинг и дальние взаимодействия в структуре эукариотических РНК», представленная на соискание ученой степени доктора химических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология, является завершенной научно-квалификационной работой, в которой подробно и всесторонне описывается влияние вторичной структуры РНК на альтернативный сплайсинг, что имеет существенное значение для понимания фундаментальных принципов созревания эукариотических транскриптов и создания систем направленного переключения сплайс-изоформ в терапевтических целях.

Диссертационная работа Первушина Дмитрия Давидовича выполнена автором самостоятельно на высоком научном и методическом уровне. Заключение и выводы, сделанные по результатам работы, обоснованы и полностью соответствуют поставленным задачам. Автореферат достаточно подробно отражает основное содержание диссертации.

Диссертация Первушина Дмитрия Давидовича соответствует требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М. В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.3. Молекулярная биология (по химическим наукам), в частности пп. 10 и 11 паспорта специальности (Биоинформатика, Молекулярное моделирование, в том числе предсказание вторичных структур РНК) 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 требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на

соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Первушин Дмитрий Давидович заслуживает присуждения ему ученой степени доктора химических наук по специальности

1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории структурного анализа биомакромолекул
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Федеральный исследовательский
центр «Казанский научный центр РАН»»
Юсупов Марат Миратович

02.09.2024