

## ОТЗЫВ

официального оппонента кандидата биологических наук

Дымовой Майи Александровны на диссертацию

Дольского Александра Алексеевича

«Некодирующие РНК в патогенезе заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой», представленной к защите на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

### Актуальность темы диссертационной работы

В геноме человека представлено большое разнообразие повторяющихся последовательностей ДНК, при этом их размер может варьировать в популяции. Иногда в случае увеличения количества повторенных единиц часть из них может приводить к заболеваниям человека. Таким примером является повтор ЦГГ, который расположен в 5'-НТО мРНК гена *FMR1*. В норме у человека находится от 5 до 50 повторенных единиц. Его дальнейшая экспансия в ряду поколений последовательно приводит к премутации (от 55 до 200 повторенных единиц) и полной мутации (более 200 повторенных единиц вместе с метилированием промоторной области гена), что будет отражаться как на экспрессии гена *FMR1*, уровне белка FMRP, так и на патологических проявлениях у пациентов. В случае премутации гена могут развиваться синдром атаксии и тремора (FXTAS), а также первичная овариальная недостаточность (FXPOI), ассоциированные с синдромом ломкой X-хромосомы (FXS). Эти синдромы возникают только у части пациентов, при этом тяжесть симптомов напрямую не коррелирует с размером ЦГГ повтора и вероятно связаны с изменением экспрессии гена *FMR1*. В случае полной мутации гена развивается синдром ломкой X-хромосомы, который связан с полным отсутствием белка FMRP у таких пациентов. Проявление заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой является событием, в котором участвуют множество молекулярных механизмов. Исследование роли микроРНК в патогенезе заболеваний, ассоциированных с FXS начинается в 2002 году, когда было обнаружено, что гомолог белка FMR1 у дрозофилы (*dFMR1*) связан с белком Dicer и является частью РНК – интерференции. Позже были применены разные подходы для поиска микроРНК, участвующих в развитии FXS.

На данный момент методов целенаправленного лечения заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомы не существует. Помимо этого, анализ размера ЦГГ повтора может применяться в качестве диагностического критерия при

планировании семьи, но с его помощью нельзя оценить риски проявлений вышеуказанных синдромов, ассоциированных с ломкой X-хромосомой у носителей премутации. Поэтому поиск новых диагностических маркеров, а также накопление новых фундаментальных знаний о молекулярных основах развития FXS остается важной, актуальной задачей. В связи с этим не вызывает сомнений актуальность работы Дольского А.А. по исследованию роли микроРНК в транскрипционной регуляции гена *FMR1*.

### **Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Основные результаты диссертационной работы получены лично автором. Анализ основных положений диссертационного исследования позволяет сделать вывод, что диссертация является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным на высоком научном уровне. Представленные в работе выводы обоснованы. Основные положения диссертационной работы опубликованы в международных и российских журналах (5 статьи), а также неоднократно докладывались на российских и международных конференциях (всего 6).

### **Достоверность и новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В работе Дольского А.А. впервые проведено исследование уровня экспрессии семи микроРНК, взаимодействующих с 3'-НТО мРНК гена *FMR1* в клеточных линиях человека с различной активностью этого гена. Также в работе описана сборка плазмидной конструкции, которая позволяет проводить оценку взаимодействия исследуемых микроРНК с целевой последовательностью мРНК. Совместно результаты этих двух исследований помогли установить какие микроРНК взаимодействуют с мРНК гена *FMR1* и изменяют свою экспрессию в ответ на изменение активности этого гена, что позволило получить новые данные о роли микроРНК в регуляции этого гена. Помимо этого, в данной работе уровень экспрессии отобранных микроРНК был проанализирован в головном мозге мышей с премутацией гена *fmr1*, что впервые позволило установить паттерн их экспрессии в зависимости от пола и возраста – важных факторов в патогенезе заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой.

### **Значимость для науки и практики полученных автором результатов**

Важное теоретическое значение имеют данные об участии микроРНК в регуляции активности гена *FMR1* и развитии заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. В работе представлен обширный и последовательный анализ уровня экспрессии микроРНК: в клеточных культурах человека, что позволило установить изменение их уровня в ответ на изменение активности гена *FMR1*; у мышей с премутацией гена *FMR1*, что позволило установить влияние возраста и пола на уровень экспрессии микроРНК; с помощью созданной плазмидной конструкции был проведен анализ из взаимодействия с 3'-НТО мРНК гена *FMR1*. В результате работы показано, что miR-139-5p является негативным регулятором активности этого гена. Также показано, что уровень экспрессии hsa-miR-182-5p повышен в клеточных линиях с полной мутацией гена и отсутствием мРНК и белка FMRP. 5.

### **Конкретные рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации**

Полученные результаты работы могут лечь в основу исследований miR-139-5p в качестве диагностического маркера для прогнозирования тяжести заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомы у пациентов с премутацией гена *FMR1*, что является практической значимостью диссертационной работы Дольского АА. Также, созданная плазмидная конструкция может быть использована в других аналогичных исследованиях роли микроРНК в регуляции активности генов-мишеней.

### **Оценка содержания диссертации, ее завершенность**

Диссертационная работа построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, а также приложений к диссертационной работе. Работа изложена на 141 странице, включает 11 рисунков, 7 таблиц, 4 приложения. Список литературы включает 233 источника. В разделе «Введение» автор очерчивает проблему, определяет цель и задачи исследования. Раздел «Обзор литературы» структурирован; хорошо освещено современное состояние науки по данной проблематике. Материалы и методы описаны достаточно подробно, чтобы можно было воспроизвести поставленные эксперименты. Используемые методики и анализ полученных не вызывают

сомнения в достоверности результатов и обоснованности выводов. Заключение в полной мере отражает суть работы, содержит обсуждение полученных результатов исследования. Анализ основных положений диссертационного исследования позволяет сделать вывод, что диссертация является законченным научно-исследовательским трудом, выполненным на высоком научном уровне. Основные положения диссертационной работы опубликованы в журналах из перечня ВАК (5 статей), а также неоднократно докладывались на российских и международных конференциях (всего 6).

### **Общая характеристика работы**

В целом диссертация Дольского А.А. оценивается положительно, однако имеются следующие замечания:

1. При выборе микроРНК лучше опираться на результаты NGS-секвенирования, проведённого самостоятельно, либо другими исследователями (например, Sotoudeh Anvari, M., Vasei, H., Najmabadi, H. et al. Identification of microRNAs associated with human fragile X syndrome using next-generation sequencing. *Sci Rep* 12, 5011 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-08916-4>). При выборе микроРНК *in silico*, основываясь на типе комплементарного связывания с 3'-НТО мРНК гена FMR1 и значении Target Score, стоит учесть данные других баз данных – Enrichr и miRNet.

2. В разделе «Введение» автор не полностью очерчивает проблематику исследования и те инструменты, при помощи которых он собирается исследовать взаимосвязь между микроРНК и развитием FXS.

3. В разделе «Обзор литературы» порой не хватает конкретики, схем и рисунков. На рисунке 2 есть необозначенные элементы. Стоит упомянуть, а какие еще механизмы помимо микроРНК также принимают участие в развитии FXTAS и FXPOI (например, RAN – трансляция).

4. В разделе «Результаты и обсуждение» стоит акцентировать, что автор принимает за активность гена FMR1 и почему?

5. В диссертации отсутствуют схемы плазмидных конструкций и клонирования, обычно это приводится в приложении.

Указанные замечания носят рекомендательный характер и никак не влияют на положительную оценку данной работы.

### **Заключение**

Таким образом, диссертация Дольского А.А. является законченной научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи - определение

роли конкретных микроРНК в регуляции транскрипции гена *FMR1*, имеющей важное значение для поиска новых диагностических маркеров, а также понимания молекулярных механизмов развития FXS, что соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Официальный оппонент,  
кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник  
лаборатории биотехнологии  
Института химической биологии  
и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской  
академии наук (ИХБФМ СО РАН)  
Почтовый адрес: 630090, г. Новосибирск,  
просп. акад. Лаврентьева, д 8  
Телефон: +7 (383) 363-51-50  
Электронная почта: dymova@niboch.nsc.ru

  
(подпись) Дымова М.А.  
(рашифровка подписи)

Дата « 06 » март 2022 г.



Федеральное государственное бюджетное учреждение наук:  
Институт химической биологии и фундаментальной медицины  
Сибирского отделения Российской академии наук  
Подпись М. А. Дымова  
Заведующий  
Зав. канцелярией Кавалева