

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук
(ИБГ РАН)

Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334

Тел.: (499)135-60-89, (499)135-98-84 Факс: (499)135-41-05

e-mail: info@genebiology.ru; <http://www.genebiology.ru>

ОКПО 00244660 ОГРН 1027739618037 ИНН/КПП 7736020369/773601001



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИБГ РАН
академик Георгиев П.Г.

04 июня 2021 года

Отзыв

ведущей организации на диссертационную работу
Драчковой Ирины Альбертовны на тему
«Влияние ассоциированных с наследственными заболеваниями
однонуклеотидных замен в ТАТА-боксах на взаимодействие с ТАТА-
связывающим белком», представленную на соискание
учёной степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология»

Актуальность исследования.

Длительное время исследователи пытаются связать особенности генотипа человека с вероятностью развития у него определенных заболеваний. Лучше всего данная взаимосвязь продемонстрирована для моногенных генетических заболеваний человека, при развитии которых определенная мутация приводит или к снижению количества белкового продукта, кодируемого данным геном, или к нарушению функциональной активности данного продукта. Существенный прогресс технологий высокопроизводительного секвенирования принес огромное количество экспериментальной информации, которая позволила выявить более сложные взаимосвязи между генотипами людей и вероятностью развития у них определенных заболеваний. Так, выяснилось, что в развитии многих известных патологий, которые ранее считались вызванными условиями среды или образом жизни, присутствует генетическая компонента.

Стоит отметить, что в пуле имеющейся информации о генотипах различных индивидуумов в настоящее время преобладают результаты секвенирования экзонов. Данный факт не вызывает удивления, так как такой экспериментальный подход является существенно более дешевым, чем полногеномное секвенирование, но при этом обладает возможностью охарактеризовать наиболее серьезные особенности генотипа, вызывающие сбой рамки считывания отдельных генов. Сложившаяся ситуация в высокопроизводительном секвенировании привела к тому, что области генома, не входящие в кодирующие области генов, исследованы на порядок слабее. С точки зрения молекулярной биологии недостаточно глубокая характеристика межгенных областей является серьезным упущением. Ведь именно в межгенных областях располагаются регуляторные элементы генома (энхансеры, локус-контролирующие районы, регуляторные элементы промоторов). Очевидно, что мутации, нарушающие работу регуляторных элементов генома, могут оказать не менее серьезное воздействие на работу определенного гена при развитии патологии, чем мутации, сбивающие рамку считывания. Вероятно, что снижение стоимости секвенирования в последние годы позволит вскоре закрыть этот информационный пробел при помощи получения пула информации о полных геномах индивидуумов в связи с их клинической картиной.

Работа Драчковой А.И. направлена на выявление вклада однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в регуляторных элементах генома (TATA-боксах и TATA-подобных элементах) в работу транскрипционного аппарата генов, вовлеченных в патогенез различных заболеваний человека. Данная работа привносит новую информацию в исследования связи SNP с работой транскрипционного аппарата. Информация, полученная автором, будет безусловно востребована в дальнейшем при изучении связи мутаций регуляторных областей генома человека и его предрасположенностью к развитию различных заболеваний. Также эта информация будет полезна и для понимания молекулярных механизмов патогенеза различных заболеваний человека.

Целью данной работы было установления влияния функционально значимых SNP в сайте связывания TBP на взаимодействие с TBP, а также экспериментальная верификация модели пошагового связывания TBP/TATA [Пономаренко и др, 2008], разработанной в ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**: 1. Создать коллекцию аннотированных SNPs TATA-боксов, для

которых показана возможность участия в формировании наследственной предрасположенности человека к заболеваниям; ее анализ с использованием уравнения пошагового связывания ТВР. 2. Экспериментальное определение аффинности взаимодействия ТВР с олигодезоксирибонуклеотидами, идентичными ТАТА-боксам канонических аллелей референсного генома и минорных аллелей. 3. Статистическая обработка экспериментальных данных и оценка соответствия прогнозов изменения аффинности ТВР *in silico* экспериментальным данным. 4. Экспериментальное определение константы скорости ассоциации и константы скорости диссоциации комплексов ТВР/ТАТА с олигодезоксирибонуклеотидами, идентичными ТАТА-боксам референсных и минорных аллелей

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Для 11 генов, вовлеченных в патогенез различных заболеваний, автором были экспериментально измерена аффинность регуляторных участков их промоторов к белку ТВР, относящемуся к общим транскрипционным факторам эукариот. В ходе *in vitro* экспериментов было исследовано, как известные SNP, будучи внесенными в регуляторный участок взаимодействия с ТВР у данных генов, влияют на изменение сродства данного белка к ДНК.

Так как белок ТВР является одним из ключевых белков аппарата транскрипции эукариот, изучение изменения силы его связывания с ДНК при внесении различных SNP, представляет собой ценную информацию о механизме транскрипции генов, вовлеченных в патогенез. Безусловно, данная информация будет востребована исследователями, которые занимаются изучением молекулярных механизмов патогенеза заболеваний человека в экспериментах *in vivo*.

Полученная автором информация о низкой аффинности ТАТА-подобного элемента гена *IL1b* к ТВР в совокупности с имеющейся информацией о активатор-зависимом способе привлечения ТВР на данный ген представляет теоретическую ценность. Данный факт свидетельствует в пользу концепции ограниченной роли ТАТА последовательностей в рекрутировании ТВР *in vivo*.

Автором был проведен анализ корреляции между экспериментально измеренными характеристиками комплексов «ТВР-ДНК» и расчётными характеристиками. Тем самым была успешно проведена верификация биоинформатического приложения для расчёта аффинности между ТАТА-боксами и ТАТА-подобными элементами с ТВР. В настоящее время приложение

SNP_TATA_COMPARATOR может считаться экспериментально верифицированным и может быть использовано исследователями в ходе своей научной работы.

Оценка содержания диссертационной работы.

Работа Драчковой А.И. изложена на 186 страницах машинописного текста и содержит 20 рисунков и 7 таблиц. Диссертация написана по стандартному плану и включает следующие разделы: “Список использованных сокращений”, “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты и обсуждение”, “Заключение”, “Выводы” и “Список литературы”.

В разделе “**Введение**” соискателем раскрывается актуальность работы, ясно сформулированы цель и задачи исследования, обоснованы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, выделены положения, выносимые на защиту, приведены публикации автора по теме диссертации, показана апробация результатов и личный вклад автора.

Раздел “**Обзор литературы**” состоит из шести частей. В первой части и второй части дана общая информация об строении промоторов эукариот, транскрибируемых РНК полимеразой II. В третьей части приведена информация относительно структуры ТВР. Остальные части литературного обзора посвящены молекулярным механизмам взаимодействия ТВР с регуляторной последовательностью и его работе в составе преинициаторного комплекса.

Обзор литературы написан структурированно, что говорит о том, что соискатель хорошо разобрался в теме.

Раздел “**Материалы и методы**” содержит подробное описание условий экспериментов. Изложение дает возможность успешно воспроизвести используемые методы.

Существенную часть раздела “**Результаты и обсуждение**” занимает описание проделанной теоретической работы по созданию коллекции SNP, входящих в состав ТАТА-боксов и ТАТА-подобных элементов генов, вовлеченных в патогенез различных заболеваний. Судя по всему, данный раздел был написан на основе статьи Савинкова и др 2009, которая и представляла собой первичную публикацию материалов данной коллекции. Несмотря на то, что с момента публикации данных материалов прошло более 10 лет, автором не было сделано попытки актуализировать представленный материал. Практически все ссылки данного раздела относятся к 2000-2010 годам.

В свою очередь, экспериментальная часть работы, выполненная автором, описана и обсуждена достаточно подробно. Правда, стоит отметить недостаточную иллюстрацию экспериментальных результатов работы. Присутствует всего лишь один рисунок с результатами экспериментов по изучению аффинности TBP in vitro в EMSA экспериментах. Подавляющая часть экспериментального материала представлена в виде таблиц. Было бы лучше представить экспериментальные результаты также в виде фотоснимков гелей в приложении к настоящей диссертации.

“**Заключение**” представляет собой краткий итог проделанной диссертантом работы. Принимая во внимание, что раздел «**Обсуждение**» был автором слит с разделом «**Результаты**», раздел «**Заключение**» стоило бы значительно расширить и иллюстрировать. Это позволило бы составить более цельное впечатление о проделанной работе и соотнести результаты, описанные в разных разделах. “**Выводы**” в целом отвечают поставленным задачам, сформулированы достаточно четко. **Автореферат** отражает содержание диссертации. Основные результаты работы опубликованы в пяти рецензируемых журналах и были представлены на международных конференциях.

Список литературы включает в себя 352 ссылки.

Замечания.

В целом диссертационная работа Драчковой И.А. включает в себя ряд интересных научных результатов. Однако, требуется уточнение ряда важных моментов:

1. Соискатель пишет, что результаты представляемой работы, опубликованы в 5 рецензируемых журналах. Стоит отметить, что 4 из 5 представленных научных статей уже были ранее включены в докторскую диссертацию Пономаренко М.П., защищенную в 2017 году. Повторное включение публикаций в защиту диссертации требует очень четкого разграничения использованных научных результатов из данных статей. В тоже время, автором в разделе «Авторский вклад» было указано только то, что часть работы была выполнена совместно с д.б.н. Пономаренко М.П. Четкого разграничения не присутствует ни в «Результатах и обсуждении», ни в «Заключении». Мы предлагаем в ходе доклада диссертанта провести четкое разграничение – какие именно результаты работ из совместных публикаций были выполнены Драчковой И.А, а какие – д.б.н. Пономаренко М.П.

2. Автор диссертации проделала большую теоретическую работу, собрав информацию о SNP, входящих в состав регуляторных элементов генов, вовлеченных в патогенез различных заболеваний. Диссертация включает в себя 352 источника литературы. К сожалению, подавляющее большинство используемой литературы является источниками более чем пятилетней давности (только 10 из 352 использованных работ были выпущены 5 и менее лет назад). Автору стоит приложить усилия и максимально актуализировать обсуждение представляемого материала. Актуализированное обсуждение можно представить в качестве части доклада диссертанта. В частности, при обсуждении частоты встречаемости отдельных SNP стоило бы использовать более свежие данные, чем проект «1000 геномов», заверченный более 10 лет назад.
3. Соискателю стоит быть более аккуратной с терминологией. Название диссертации: «Влияние ассоциированных с наследственными заболеваниями однонуклеотидных замен в ТАТА-боксах на взаимодействие с ТАТА-связывающим белком». В тоже время из 11 регуляторных последовательностей генов, исследованных автором в *in vitro* экспериментах, только 2 являются ТАТА-боксами, в то время как остальные относятся к ТАТА-подобных или вообще ТАТА-не содержащим элементам.
4. В обсуждении полученных результатов автором полностью игнорируется наличие у человека TRF белков (TBP-related factors). В тоже время, привнесение данного факта в обсуждение могло бы дать интересный контекст. В частности, можно было бы обсудить возможность конкуренции TBP и TRF факторов при связывании ТАТА-боксов и ТАТА-подобных последовательностей, а также, изменения, которые исследуемые SNP могут вносить в данную конкуренцию. Мы предлагаем автору добавить данное обсуждение в свой диссертационный доклад.
5. В разделе «Заключение» автор указывает на то, что современный взгляд на формирование преинициаторного комплекса состоит в том, что «собственная аффинность ТАТА-боксов играет ограниченную роль в привлечении TBP на промотор». Учитывая тему представляемой диссертации, данный вопрос является очень важным и стоило бы его подробно обсудить. К сожалению, в «Заключении» автор приводит лишь ссылки на обзоры и не приводит ссылок на экспериментальные статьи, которые бы подтверждали данное заключение.

Мы предлагаем в ходе диссертационного доклада автору обратить внимание на данный вопрос и детально обсудить какие же в настоящее время имеются представления относительно механизма рекрутирования ТВР на промотор регулируемых им генов. Было бы уместно использовать и собственные результаты для обсуждения данного вопроса. Например, одним из примеров описанных молекулярных механизмов привлечения ТВР можно было бы выбрать промоторные элементы генов, активирующихся в ходе воспаления.

Заключение.

По актуальности избранной темы, степени обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверности и новизне, диссертационная работа Драчковой Ирины Альбертовны «Влияние ассоциированных с наследственными заболеваниями однонуклеотидных замен в ТАТА-боксах на взаимодействие с ТАТА-связывающим белком» соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям, выдвигаемым на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а её автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Отзыв обсуждён и утверждён на межлабораторном научном семинаре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук (01.06.2021, протокол №1)

**Кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
Зав. группой динамики транскрипционных комплексов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук**

В.В.В.

Воробьева Надежда Евгеньевна

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

Тел: (926) 279-02-19

E-mail: vorobyeva@genebiology.ru



ПОДПИСЬ *А.Е. Воробьева*

ДИРЕКТОРА ИБГ РАН

МАНСУРОВА Г.В.