

ОТЗЫВ

официального оппонента Егоровой Татьяны Владимировны на диссертационную работу

Грищенко Ирины Владимировны

«Исследование нестабильности экзогенных повторов (CGG)_n в клеточных моделях»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Исследование причин экспансии микросателлитных повторов является фундаментальной темой в медицинской генетике, поскольку эта мутация приводит к ряду неизлечимых неврологических заболеваний человека. Несмотря на многолетние поиски природы развития этой мутации, комплексной и учитывающей все нюансы модели предложено не было.

Диссертационное исследование И. В. Грищенко направлено на изучение особенностей развития нестабильности CGG-повтора в модельных клеточных линиях. В диссертационной работе на примере гена *FMR1* проведен комплексный анализ возможных причин появления экспансии CGG-повтора, а также оценена степень нестабильности этих повторов в клеточных линиях человека.

Работа содержит ряд новых интересных результатов, научная достоверность и актуальность которых не вызывает сомнения. Использованный цитогенетический анализ позволил впервые обнаружить формирование G-квадруплексов в промоторной области гена *FMR1*. Обнаружено, что образование альтернативной вторичной структуры возможно только при повышенной по сравнению с нормальной длиной повтора, что дает основания предположить наличие связи между особенностями вторичной структуры CGG-повторов с развитием в них нестабильности при транскрипции гена.

В работе впервые показано, что вблизи локуса FRAXA гена *FMR1* концентрация белков, связанных с транскрипцией, уменьшается с увеличением длины повторенной последовательности. При этом низкая обогащенность этими белками самой длинной последовательности может свидетельствовать о том, что транскрипция не вносит или вносит лишь небольшой вклад в развитие нестабильности мутантных повторов.

Для оценки влияния транскрипции и репарации в развитие экспансии и сокращения повторенных последовательностей были разработаны новые модельные системы, позволяющие регулировать работу представленных клеточных процессов. Созданный автор подход на основе модельных клеточных линий позволил с хорошей точностью определить, что транскрипция премутантных последовательностей при нарушении репарации приводит к их нестабильности, а именно к сокращению числа

мономеров при продолжительном культивировании клеток. Предложенные механизмы развития заболеваний, связанных с экспансией повтора, могут быть напрямую использованы для улучшения эффективности терапевтических методов лечения и обнаружения таких болезней, как синдром ломкой X хромосомы. В связи с этим можно определенно сказать, что постановка задачи в диссертационной работе является крайне **актуальной**.

Стоит отметить, что **новизна** диссертационной работы состоит прежде всего в разработке методологии определения вкладов транскрипции и ассоциированной с ней репарации в развитие нестабильности повторов в геноме.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, списка цитируемой литературы из 243 источников, списка сокращений и приложения. Полный объем диссертации составляет 169 страниц, она включает 19 рисунков и 9 таблиц.

Во Введении обоснованы актуальность и новизна работы, обоснована ее практическая ценность, описаны цели и задачи исследования, изложены положения, выносимые на защиту, представлен список публикаций по теме диссертации и описаны вопросы, рассматриваемые в диссертации.

Обзор литературы написан очень качественно, он прекрасно освещает современное состояние знаний в области исследуемой проблемы. Подробно описаны механизмы патогенеза заболеваний, ассоциированных с экспансией повторов, а также рассмотрены вероятные пути развития самой мутации. При этом в отдельный раздел вынесено обсуждение особенностей CGG-повтора, что дает возможность погрузиться в тему представленного диссертационного исследования.

Глава **Материалы и методы** посвящена описанию методов, использованных автором для решения поставленных задач и достижения обозначенных целей. Все использованные методы описаны детально и подробно, что позволяет понять ход каждого эксперимента и методы анализа получаемых данных. В работе использовано большое количество методов, обеспечивающих проведение комплексного исследования природы нестабильности CGG-повтора. Все методы адекватны и современны.

Глава **Результаты** разбита на пять параграфов, что согласуется с числом пунктов Выводов. Все параграфы объединяет проведение исследования на гене FMR1, содержащим CGG-повтор. В каждом из параграфов последовательно описаны результаты визуализации G-квадруплексов в повторенных участках гена (пункт 3.1), анализ насыщения участков гена белками, ассоциированными с транскрипцией для повторов различной длины (пункт 3.2), создание модельных систем с CGG-повторами (пункт 3.3) и

мономеров при продолжительном культивировании клеток. Предложенные механизмы развития заболеваний, связанных с экспансией повтора, могут быть напрямую использованы для улучшения эффективности терапевтических методов лечения и обнаружения таких болезней, как синдром ломкой X хромосомы. В связи с этим можно определенно сказать, что постановка задачи в диссертационной работе является крайне **актуальной**.

Стоит отметить, что **новизна** диссертационной работы состоит прежде всего в разработке методологии определения вкладов транскрипции и ассоциированной с ней репарации в развитие нестабильности повторов в геноме.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, списка цитируемой литературы из 243 источников, списка сокращений и приложения. Полный объем диссертации составляет 169 страниц, она включает 19 рисунков и 9 таблиц.

Во Введении обоснованы актуальность и новизна работы, обоснована ее практическая ценность, описаны цели и задачи исследования, изложены положения, выносимые на защиту, представлен список публикаций по теме диссертации и описаны вопросы, рассматриваемые в диссертации.

Обзор литературы написан очень качественно, он прекрасно освещает современное состояние знаний в области исследуемой проблемы. Подробно описаны механизмы патогенеза заболеваний, ассоциированных с экспансией повторов, а также рассмотрены вероятные пути развития самой мутации. При этом в отдельный раздел вынесено обсуждение особенностей CGG-повтора, что дает возможность погрузиться в тему представленного диссертационного исследования.

Глава **Материалы и методы** посвящена описанию методов, использованных автором для решения поставленных задач и достижения обозначенных целей. Все использованные методы описаны детально и подробно, что позволяет понять ход каждого эксперимента и методы анализа получаемых данных. В работе использовано большое количество методов, обеспечивающих проведение комплексного исследования природы нестабильности CGG-повтора. Все методы адекватны и современны.

Глава **Результаты** разбита на пять параграфов, что согласуется с числом пунктов Выводов. Все параграфы объединяет проведение исследования на гене FMR1, содержащим CGG-повтор. В каждом из параграфов последовательно описаны результаты визуализации G-квадруплексов в повторенных участках гена (пункт 3.1), анализ насыщения участков гена белками, ассоциированными с транскрипцией для повторов различной длины (пункт 3.2), создание модельных систем с CGG-повторами (пункт 3.3) и

результаты исследования с их помощью нестабильности экзогенных повторов в модельных клеточных линиях (пункт 3.4), и анализ нестабильности представленного типа повторов в геномных локусах человека (пункт 3.5). Все полученные автором результаты достоверны и не вызывают сомнения.

Все вынесенные на защиту положения предстают собой новые научные результаты. Выводы хорошо обоснованы. Достоверность полученных результатов обеспечена применением известных, хорошо апробированных экспериментальных методик, воспроизводимостью и согласованностью с предыдущими исследованиями.

Работа оформлена в соответствии с требованиями ГОСТ к оформлению диссертационных работ, написана логично. Стилистических и грамматических ошибки присутствуют в небольшом количестве, но не умаляют ценности работы.

По тексту диссертации есть некоторые замечания:

1. Во введении (стр. 9) и разделе 1.3.1 (стр. 43) автор приводит частоту возникновения синдрома ломкой X-хромосомы и премутации в популяции, но не уточняет, что это конкретно за популяция людей: общемировая, или какая-то конкретная географическая область.
2. Также во введении (стр. 9) приведены данные по финансовым затратам на одного пациента с подтвержденной фраксопатией в США и Европе, что подтверждает важность и актуальность темы диссертационной работы. Известна ли автору подобная статистика по Российской Федерации?
3. Автор иногда в тексте использует английские аббревиатуры терминов, у которых есть общепринятые аналоги в русском языке (например: SNP, UTR и т.д.), что усложняет восприятие рукописи. Также, уместно было бы в тексте диссертации расшифровывать английские аббревиатуры заболеваний при первом упоминании (например: на стр. 30 абзац начинается с аббревиатуры "DM1", и до начала следующего абзаца непонятно, что это, оказывается, миотоническая дистрофия I типа).

Указанные недостатки не снижают общую высокую оценку диссертации И. В. Грищенко. Представленная ею работа является законченным научным исследованием, обладающим общей логикой и внутренним единством. Главные достижения исследования достаточно полно отражены в основных результатах и выводах работы. Основные научные результаты опубликованы в четырех статьях в зарубежных и российских научных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Работа прошла апробацию в виде 8 докладов на международных и всероссийских научных конференциях.

результаты исследования с их помощью нестабильности экзогенных повторов в модельных клеточных линиях (пункт 3.4), и анализ нестабильности представленного типа повторов в геномных локусах человека (пункт 3.5). Все полученные автором результаты достоверны и не вызывают сомнения.

Все вынесенные на защиту положения предстают собой новые научные результаты. Выводы хорошо обоснованы. Достоверность полученных результатов обеспечена применением известных, хорошо апробированных экспериментальных методик, воспроизводимостью и согласованностью с предыдущими исследованиями.

Работа оформлена в соответствии с требованиями ГОСТ к оформлению диссертационных работ, написана логично. Стилистических и грамматических ошибки присутствуют в небольшом количестве, но не умаляют ценности работы.

По тексту диссертации есть некоторые замечания:

1. Во введении (стр. 9) и разделе 1.3.1 (стр. 43) автор приводит частоту возникновения синдрома ломкой X-хромосомы и премутации в популяции, но не уточняет, что это конкретно за популяция людей: общемировая, или какая-то конкретная географическая область.
2. Также во введении (стр. 9) приведены данные по финансовым затратам на одного пациента с подтвержденной фраксопатией в США и Европе, что подтверждает важность и актуальность темы диссертационной работы. Известна ли автору подобная статистика по Российской Федерации?
3. Автор иногда в тексте использует английские аббревиатуры терминов, у которых есть общепринятые аналоги в русском языке (например: SNP, UTR и т.д.), что усложняет восприятие рукописи. Также, уместно было бы в тексте диссертации расшифровывать английские аббревиатуры заболеваний при первом упоминании (например: на стр. 30 абзац начинается с аббревиатуры "DM1", и до начала следующего абзаца непонятно, что это, оказывается, миотоническая дистрофия I типа).

Указанные недостатки не снижают общую высокую оценку диссертации И. В. Грищенко. Представленная ею работа является законченным научным исследованием, обладающим общей логикой и внутренним единством. Главные достижения исследования достаточно полно отражены в основных результатах и выводах работы. Основные научные результаты опубликованы в четырех статьях в зарубежных и российских научных журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Работа прошла апробацию в виде 8 докладов на международных и всероссийских научных конференциях.

Публикации и автореферат полностью соответствуют содержанию диссертации. В работе четко обозначен личный вклад автора, ссылки на источники выполнены корректно.

Научная и практическая значимость работы, ее актуальность, новизна и степень достоверности полностью соответствуют критериям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук в 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 механизмов контроля трансляции
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
«Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук» (ИМБ РАН)
Почтовый адрес: 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32
Телефон: 8(499)135-23-11, 8(499)135-11-60
Электронная почта: tatvladegorova@gmail.com

/__Егорова Т.В.__/

Подпись к.б.н. Егоровой Татьяны Владимировны заверяю.
Ученый секретарь ИМБ РАН к.в.н. Бочаров Александр Анатольевич



«29» апреля 2022 г.