

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ИНСТИТУТ
ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ

СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИХБФМ СО РАН)

Просп. ак. Лаврентьева, 8, г. Новосибирск, 630090
тел. (383) 363-51-50
факс. (383) 363-51-53
E-mail: niboch@niboch.nsc.ru
http://www.niboch.nsc.ru

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального
государственного бюджетного учреждения
науки Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки Института
химической биологии и фундаментальной
медицины Сибирского отделения
Российской академии наук



Д.В. Пышный

05.05.2022 № 15245-12-05/301

На № _____

«05» май 2022 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Грищенко Ирины Владимировны «Исследование нестабильности экзогенных повторов (CGG)_n в клеточных моделях», представленной к защите на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

Актуальность темы исследования и ее связь с планами отраслевой науки

Диссертационная работа Грищенко Ирины Владимировны посвящена исследованию причин нестабильности CGG-повтора в геноме человека. Эта мутация, происходящая в 5'-UTR гена *FMR1*, представляет собой причину тяжелых нейродегенеративных заболеваний человека, таких как синдром ломкой X-хромосомы, а также синдром первичной овариальной недостаточности и синдром атаксии/тремора, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Данное направление представляет научный интерес, поскольку проблема нестабильности этого микросателлитного повтора на сегодняшний день изучена недостаточно. Рядом исследователей были предложены объяснения причин возникновения нестабильности на основе экспериментальных данных, однако эти работы не позволяют полностью объяснить картину экспансии и сокращений повторов, наблюдаемую у

пациентов. В меньшей степени рассмотрено влияние транскрипции и ассоциированной с ней репарации на стабильность CGG-повтора. Кроме того, проведенные исследования не анализируют типы повторенных последовательностей, приводящих к болезням по всему геному, что значительно сокращает возможность получения данных о природе нестабильности этих последовательностей и их возможных функциях. Выяснение природы нестабильности CGG-повтора позволит создать действенные терапевтические подходы, улучшит методики прогнозирования заболевания, а знание о склонности к изменению количества мономеров этого типа повтора в других районах генома позволит понять причину развития заболеваний с аналогичным патогенезом. Таким образом, основная цель, сформулированная в диссертационной работе, представляется весьма актуальной.

Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научная новизна представленной работы обоснована. Во-первых, в ней рассмотрено формирование альтернативных вторичных структур ДНК — G-квадруплексов в геноме постоянных клеточных линий человека в локусе, содержащем ген *FMR1*, экспансия CGG-повтора в котором приводит к неизлечимым нейродегенеративным заболеваниям. Впервые показана склонность повтора премутантной и мутантной длины формировать подобные структуры. Благодаря этому можно предположить их возможную роль в развитии дальнейшей нестабильности.

Впервые оценена локализация белков CSB и ERCC2, участвующих в репарации во время транскрипции, в локусе *FRAXA*, а обнаруженные закономерности позволяют предположить возможную роль ассоциированной с транскрипцией репарации в формировании нестабильности повтора.

В данном исследовании впервые рассмотрена нестабильность CGG-повтора в генно-инженерной модели, позволяющей оценить изменения в количестве мономеров повтора нормальной и премутантной длины в ответ на

активацию транскрипции и ассоциированной с ней репарации. Ранее подобных моделей для оценки нестабильности CGG-повтора предложено не было. Обнаружение сокращения количества мономеров данного типа повтора при активации транскрипции объясняет феномен соматического мозаицизма, который характерен для различных тканей у пациентов.

Значимость для науки и производства (практики) полученных автором диссертации результатов

Результаты диссертационного исследования Грищенко И. В. обладают несомненной фундаментальной, а также практической значимостью. Совокупность сформулированных положений и выводов дополняет понимание механизма формирования нестабильности, что, безусловно, ляжет в основу будущих исследований в этой области. Созданные клеточные модельные системы могут быть использованы в других исследованиях, посвященных нестабильности микросателлитов. Указанные направления могут стать основой разработки терапевтических подходов для борьбы с нейродегенерацией.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и заключений.

Положения, выносимые на защиту, сформулированы кратко и убедительно и основаны на обширном экспериментальном материале, полученном автором. В ходе работы выявлен ряд закономерностей влияющих на механизмы формирования нестабильности повтора. Корректность сделанных выводов подтверждается подробным описанием экспериментальных процедур и обсуждением полученных результатов.

Работа прошла широкую апробацию на 8 международных конференциях, а ее результаты отражены в публикациях в рецензируемых изданиях из списка ВАК.

Общая оценка работы

Работа выстроена по классической схеме и содержит все необходимые разделы. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, обсуждения результатов, заключения, выводов, а также списка цитируемой литературы (включает 243 источника). Диссертация изложена на 169 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц, 19 рисунков и 4 приложения.

Общее впечатление от представленной диссертации положительное. Работа отличается глубиной, последовательностью и тщательностью изложения. Текст хорошо структурирован и читается легко.

Во **введении** автор обосновывает и раскрывает актуальность выбранной решаемой научной проблемы, формулирует цель и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, приводит список основных положений, выносимых на защиту, демонстрирует апробацию полученных результатов и приводит личный вклад автора.

Обзор литературы состоит из нескольких глав и описывает многие аспекты заявленной проблемы, начиная с заболеваний, ассоциированных с нестабильностью повторов, и заканчивая молекулярными основами развития нестабильности повторов. Литературный обзор изложен на 35 страницах и хорошо структурирует информацию о природе нестабильности микросателлитов, полученную за последние годы. Детальная теоретическая проработка актуальности заявленной проблемы дополнительно иллюстрируется обзорной публикацией соискателя в сборнике «Mechanisms of Genome Protection and Repair». Отдельно стоит отметить высокоинформативную Таблицу 1. Грищенко И. В. отмечает комплексный характер исследуемой проблемы и в заключении обзора акцентирует внимание на «белых пятнах» в данной области и обосновывает необходимость проведения исследований, приведенных в диссертационной работе.

Материалы и методы описаны подробно и полностью соответствуют решаемым задачам. Раздел содержит основную информацию по

использованным в работе материалам и подробно описывает основные методы исследования. В работе использованы разнообразные современные молекулярно-генетические экспериментальные методики такие, как иммунопреципитация хроматина, дизайн и сборка генно-инженерных конструкций, получение трансгенных клеточных линий и др. Возможно, стоило бы также внести в раздел данные о методах визуализации продуктов, разделенных в агарозном и белковом гелях, а также более подробную информацию о сорбентах и хроматографических колонках. В целом, все использованные методы описаны достаточно детально и могут быть при необходимости воспроизведены.

Результатам и обсуждению отведен самый большой раздел диссертации (занимает 52 страницы), он разделен на несколько глав, последовательно дополняющих друг друга и формирующих целостную картину исследования. Автор придерживается порядка поставленных в разделе «введение» задач, полученные результаты и сформулированные выводы полностью с ними согласуются. Сбор данных проведен корректно, с использованием адекватных экспериментальных методов, наличия необходимых контролей, биологических и технических повторов, статистической обработки. Восприятие изложенных данных несколько осложняется непрерывным перечислением проделанных экспериментов и полученных результатов. Местами ощущалась нехватка анализа полученных данных, обсуждения того, как они соотносятся с современными представлениями в данной области, и формулировки промежуточных выводов и гипотез.

При прочтении работы возникает ряд вопросов и замечаний:

1. Несмотря на полноту литературного обзора остро ощущалась нехватка иллюстративного материала. Например, схема сложного и многокомпонентного механизма TC-NER существенно упростила бы восприятие материала, обеспечила бы понимание выбора объектов исследования для реализации задачи 2 и подготовила бы читателя к разделу 3.2 «Результаты и обсуждение». Аналогичное замечание к

разделу «материалы и методы»: автор перечисляет компоненты плазмидного вектора, описывает сборку сложных генно-инженерных конструкций, в то время как приведение карты плазмиды или схемы клонирования облегчило бы понимание описываемых генетических манипуляций. Примечательно, что схема плазмид представлена в разделе «результаты и обсуждение», однако в разделе «материалы и методы» отсутствует даже ссылка на этот рисунок.

2. Можно ли оценить специфичность BG4? Какова вероятность ложноположительного сигнала при использовании BG4 в иммуноокрашивании и FISH гибридизации?
3. В результате последовательного иммуноокрашивания и FISH гибридизации автором была обнаружена колокализация сигналов антитела BG4 и зонда с последовательностью гена *FMR1* в 86% случаев для клеточной линии, содержащей премутантное количество повтора и в 78% случаев для клеточной линии, содержащей мутантное количество повтора. Означает ли это, что в случае премутантного состояния образуется больше G-квадруплексов, чем в случае мутантного? Чем это можно объяснить?
4. Рисунок 8 трудно интерпретировать, поскольку не указано, чем отличаются дорожки 5, 6 и 7. Предположительно, в дорожках содержатся разные клеточные препараты, однако, это не отражено в тексте.
5. При поиске автором условий культивирования бактерий, при котором повтор будет наиболее стабилен, был выбран способ трансформации методом теплового шока клеток штамма NEB Stable с дальнейшим культивированием не более 24 часов. Любопытным феноменом оказался тот факт, что в данных условиях после 3-х суток культивирования наблюдается резкое уменьшение повтора до 30-ти триплетов для всех без исключения бактериальных клонов, чего не наблюдалось в других условиях. С чем это может быть связано, и воспроизводился ли такой результат?

6. В Таблице 5 автор представляет данные о нестабильности CGG-повтора в течение 10 суток во время транскрипции при отсутствии/наличии репликации. Утверждается, что CGG-повтор премутантной длины показывает тенденцию к нестабильности при активации транскрипции. Однако, следуя этим рассуждениям, тенденцию можно уловить и при активации репликации, причем тенденцию стабилизации (сокращение событий изменения размера повтора). Чем это может быть вызвано и как согласуется с литературными данными?
7. В Таблице 6 автор оценивает нестабильность повтора при культивировании клеточных линий в течение 6 месяцев, однако в таблице представлены данные только для 1-го и 6-го месяцев культивирования, хотя сбор образцов проводился каждый месяц. Представление данных за все месяцы позволило бы пронаблюдать как меняется длина повтора в динамике и в большей степени проиллюстрировала бы разницу в изменении размера повтора при наличии и отсутствии транскрипции.
8. Автор, несомненно, доказывает роль транскрипции и ассоциированной с ней репарации в развитии нестабильности повтора. В ходе анализа результатов в некоторых случаях допускается возможный вклад репарации в экспансию/сокращение повтора, однако, в литературном обзоре обсуждение роли репарации в упомянутых процессах практически отсутствует. При этом роли транскрипции и репликации отводится по целому разделу.
9. Имеется небольшое количество технических замечаний. Так в тексте присутствует некоторое количество опечаток, неточностей в названиях, несогласованных предложений, неудачных формулировок, стилистических неточностей. Перекрестные ссылки внутри текста не оформлены в едином стиле. Некоторые источники в списке цитируемой литературы оформлены с явным отклонением от ГОСТ. Однако эти технические огрехи не снижают ценности работы.

В результате можно заключить, что научная значимость данной работы и квалификация соискателя не вызывают сомнений.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Содержание автореферата полностью отражает основные главы диссертации и соответствует положениям, отраженным в диссертационной работе.

Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Основные результаты, изложенные в диссертации, представлены в 4 публикациях в рецензируемых изданиях, соответствующих требованиям ВАК Министерства науки и высшего образования РФ.

Заключение

Диссертация Грищенко Ирины Владимировны является научно-квалификационной работой, в которой рассмотрены особенности нестабильности CGG-повтора в ответ на активацию транскрипции в генно-инженерных клеточных моделях, а также особенности этих повторов в геноме, в частности образования ими G-квадруплексов и локализация подобных последовательностей в различных геномных локусах. Результаты работы представляют собой важный этап в понимании причин нестабильности CGG-повтора в геноме человека. Проведенное исследование актуально, а полученные экспериментальные данные представляют фундаментальную ценность для молекулярной биологии и смежных областей и перспективы для практического использования. Достоверность полученных экспериментальных данных не вызывает сомнений. Работа представляет собой законченное, самостоятельное исследование, ее тема и содержание полностью согласуется с шифром специальности 1.5.3 – молекулярная биология, 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.

Работа обсуждена, отзыв заслушан и одобрен на заседании межлабораторного семинара ЛГБИ, ЛБХФ и ОЦГПМИ ИХБФМ СО РАН протокол № 2 от «28» апреля 2022 года.

Отзыв составил:
научный сотрудник,
кандидат химических наук
Электронная почта: Aend@niboch.nsc.ru


Ендуткин А. В.
«05» мая 2022 г.

Подпись заверена
Заместитель директора ИХБФМ СО РАН


Коваль В. В.

Сведения об организации:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

Почтовый адрес: Российская Федерация, г. Новосибирск
630090, Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8
Тел.: +7(383) 363-51-50
Адрес официального сайта: <http://www.niboch.nsc.ru/>
Электронная почта: niboch@niboch.nsc.ru