

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Арковой Ольги Владимировны «Изучение потенциально функционально значимых полиморфизмов ТАТА-боксов промоторов генов липидного метаболизма человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «генетика» - 03.02.07

Задачи диссертационной работы Арковой Ольги Владимировны направлены на решение фундаментальной проблемы современной биологии – функциональной аннотации разнообразия структуры генов человека, в том числе регуляторных областей. Носительство определенных аллелей генов, изменяющих функциональные характеристики или количество соответствующих белков, может лежать в основе генетической предрасположенности человека к патологиям. Стремительное накопление знаний о новых мутациях и полиморфизмах (SNP, single nucleotide polymorphism) ставит задачу разработки эффективных подходов к прогнозированию и экспериментальному подтверждению значимости выявляемых полиморфизмов на уровне фенотипа. В связи с этим работа, выполненная О.В. Арковой по выбору потенциально функционально значимых SNP регуляторных районов из числа ранее не исследованных и подтверждению их значимости в эксперименте, представляется чрезвычайно актуальной.

Представленная автором работа проведена с использованием разработанного ранее в ФЦ ИЦиГ СО РАН оригинального компьютерного метода SNP_TATA_Comparator и убедительно подтвердила его эффективность для предсказания функциональной значимости мутаций ТАТА-боксов промоторов генов человека. Другим важным достижением настоящей работы является определение тонких механизмов и построение кинетических моделей взаимодействия ТАТА-связывающего белка (ТСБ) человека с аллельными вариантами ТАТА-боксов реальных промоторов генов человека.

В диссертационной работе О.В. Арковой проведен компьютерный анализ влияния на изменение сродства ТАТА-связывающего белка к ДНК ранее неисследованных 388-ти SNP в кор-промоторных районах 62-х генов ассоциированных с пищевым поведением человека. Экспериментальная оценка прогнозируемых изменений проведена для выбранных на основе полученных результатов наиболее перспективных 8-ми SNP в составе 5-ти генов, прямо или косвенно участвующих в липидном метаболизме. Комплексный характер работы определяет значительный объем диссертации О.В. Арковой. Построена диссертационная работа традиционным образом и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 229 страницах, содержит 21 рисунок,

10 таблиц, 4 схемы, 5 приложений. Библиографический список включает 243 литературных источника.

Во введении к представленной диссертации автор четко формулирует цель работы и приводит задачи, которые необходимо решить. Содержательный обзор литературы освещает современное состояние знаний в области структуры и функционирования ТАТА-содержащих промоторных районов, их взаимодействия с белками транскрипционного комплекса, в том числе, ТАТА-связывающим белком. В обзоре приведены литературные данные об ассоциации ранее исследованных полиморфизмов ТАТА-боксов некоторых генов человека с фенотипическими признаками. Обзор написан хорошим языком, сопровождается иллюстрациями, на его основании можно сделать заключение об актуальности тех исследований, которые проведены автором. Однако в случае публикации обзора в виде статьи можно рекомендовать усилить его актуальность рассмотрением публикаций 2016 – 2017 гг, которых мало в списке процитированной литературы.

Экспериментальная часть, изложенная во 2-й главе, содержит полную информацию об использованных реагентах и методах. Приведены ссылки на электронные ресурсы, использованные в настоящей работе для селекции наиболее перспективных для функциональной аннотации SNP. Подробно описаны и проиллюстрированы методики наработки и выделения очищенного рекомбинантного ТАТА-связывающего белка, наработки плазмидных конструкций для определения активности репортерного гена LUC, определение кинетических констант комплексов ТСБ с олигодезоксирибонуклеотидами, идентичными ТАТА-боксам, с использованием методов задержки ДНК в геле и флуоресцентной спектроскопии в режиме реального времени.

Комплексный подход позволил автору не только прогнозировать влияние конкретных SNP в составе ТАТА-последовательности на связывание с ТСБ, но в этой же работе подтвердить прогнозы экспериментальным путем. В 3-ей главе при описании и обсуждении результатов Ольга Владимировна продемонстрировала высокую прогностическую эффективность Web сервиса SNP_TATA_Comparator для оценки сродства ТСБ к ТАТА-боксам референсных и минорных аллелей различных генов, что открывает пути решения новых задач по выявлению генетических предикторов ряда заболеваний. В представленной работе выявлены ранее неисследованные мутации регуляторных областей генов LEP и TPI, значительно изменяющие сродство к ТАТА-связывающему белку. Кинетический анализ формирования комплексов ТСБ с ДНК с использованием метода «задержки ДНК в геле» позволил автору установить, что изменение сродства происходит в результате изменения скоростей образования комплексов ТСБ/ОДН, а также скоростей их распада. Полученные результаты помогут расширить список генетических предикторов в результате проведения трансляционных исследований ассоциации

выявленных SNP с патологиями, что является важным практическим достижением. В теоретическом плане важным достижением работы является также выявление закономерностей образования комплексов ТСБ/ОДН методом флуоресцентной спектроскопии в режиме реального времени. Ольга Владимировна установила, что вероятность образования комплексов ТСБ/ОДН по разветвленному пути через промежуточные стадии возрастает с увеличением длины ОДН, а также при возрастании концентрации ТАТА-связывающего белка. Интересно, что прогнозы, сделанные автором на основании исследований *in silico*, подтвержденные *in vitro* в бесклеточной системе, нашли также подтверждение по результатам экспрессии репортерного гена LUC (светлячковой люциферазы) в клетках человека в культуре. Сравнение влияния мутантных ТАТА-боксов с их референсными последовательностями выявило хорошую корреляцию изменений экспрессии гена с прогнозами.

Полученные О.В. Арковой результаты достоверны, выводы, заключающие диссертацию, корректны, обоснованы, и соответствуют поставленным задачам. Работа представляет собой завершённое целостное исследование, выполненное на высоком методическом уровне. Представленная работа носит не просто квалификационный характер, а имеет самостоятельное значение для дальнейшего развития функциональных исследований известных и новых полиморфизмов регуляторных районов различных генов человека, что важно при их практическом применении для формирования групп риска ряда патологий, в том числе связанных с нарушением липидного обмена.

Качество оформления диссертационной работы, в целом, - высокое; хотя работа содержит некоторое количество неудачных выражений, неточностей и опечаток. Например, в тексте диссертации нет пояснения к рисункам 15 и 16, указывающим, какой по длине олигодезоксирибонуклеотид использовался для получения представленных результатов, схемы 3 и 4 в диссертации представляют полную копию схем 1 и 2. Однако некоторые погрешности оформления не снижают высокого уровня представленной работы. По результатам исследования опубликованы 14 статей в рецензируемых журналах, из них 8 перечня ВАК, 4 тезиса в сборниках трудов конференций, а также сделаны сообщения на специализированных российских конференциях. Автореферат отражает основное содержание диссертационного исследования.

Диссертационная работа Арковой Ольги Владимировны по объёму и значимости полученных результатов представляет собой законченную научно-исследовательскую работу, содержащую решение актуальной задачи по выявлению и верификации в эксперименте новых функционально значимых полиморфизмов ТАТА-боксов промоторов генов человека и определению молекулярных механизмов их взаимодействия с ТАТА-связывающими белками. Представленное исследование

имеет существенное значение для генетики и молекулярной медицины. Диссертационная работа полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и ее автор, Аркова Ольга Владимировна, несомненно, заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности “генетика” - 03.02.07.

Доктор биологических наук
старший научный сотрудник
лаборатории молекулярной медицины
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института химической
биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук
630090, г. Новосибирск, пр. Академика
Лаврентьева, д.8
Тел. +7 (383) 363 5150, 8 913 958 5356
rykova.elena.2014@gmail.com

Рыкова Е.Ю.

Подпись Е.Ю. Рыковой заверяю.
Ученый секретарь ИХБФМ СО РАН
к.х.н.



Пестряков П.Е.