

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу 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 03.02.07 – генетика

Актуальность исследования

Изучение ассоциаций аллельных вариантов генов с риском развития различных патологий человека является одним из активно развивающихся направлений современной генетики. Важной проблемой таких исследований является доказательство функциональности (влияния на фенотипические признаки) выявленных полиморфных вариантов. Именно этот аспект генетического полиморфизма исследуется в диссертационной работе Арковой Ольги Владимировны. Предметом ее исследования является SNP промотора некоторых генов человека, в частности липидного обмена, что представляет особый интерес, так как однонуклеотидные замены в коровом промоторе, содержащем ТАТА-бокс, пока еще остаются малоисследованными. В связи с этим, поставленная в работе цель исследовать однонуклеотидные полиморфизмы ТАТА-боксов промоторов генов липидного метаболизма человека и их анализ *in silico*, *in vitro* и *in vivo* для выявления потенциально функционально значимых вариантов является актуальной и своевременно поставленной научной проблемой.

Научная новизна представленной диссертационной работы не вызывает сомнения, так как многие результаты были получены, действительно, впервые. Так, впервые с помощью методов *in silico* проведено предсказание неаннотированных однонуклеотидных замен ТАТА-боксов промоторов генов человека и осуществлено экспериментальное подтверждение функциональности выявленных замен. Для этой цели использована разработанная в ИЦиГ СО РАН компьютерная система SNP_TATA_Comparator. Экспериментальная верификация была осуществлена *in vitro* с использованием метода задержки ДНК в геле, метода остановленной струи и флуоресцентного резонансного переноса энергии, и *in vivo*

на культуре клеток показала высокую корреляцию опыт/прогноз ($r=0.89$). Впервые автором получены кинетические характеристики комплексов ТАТА-связывающих белков (ТСБ) с олигодезоксинуклеотидами, идентичными ТАТА-боксам с фланкирующими нуклеотидами анцестральных и минорных аллелей ряда генов человека, которые по прогнозам могут быть ассоциированы с повышенным риском возникновения наследственных нарушений энергетического метаболизма.

Теоретическая и практическая значимость результатов диссертационного исследования. Результаты диссертационной работы представляют интерес для современной науки, так как используемые автором подходы позволяют установить функциональную значимость однонуклеотидных замен в промоторных участках генов. В свою очередь, это позволяет понять причины изменений в экспрессии генов, что важно для дальнейших исследований многих патологий человека, включая нарушение липидного обмена. Результаты могут иметь и практическую значимость, так как выявленные полиморфные варианты исследуемых генов человека могут быть использованы в будущем в клинической практике для профилактики и лечения патологий, связанных с нарушениями липидного обмена.

Степень достоверности и обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Основные результаты диссертационной работы получены лично автором. Достоверность полученных результатов не вызывает сомнения. С помощью методов *in silico* автором выбраны возможные однонуклеотидные замены в промоторах генов, содержащих ТАТА-боксы, и проведено экспериментальное подтверждение функциональности таких замен. Для этого автором использованы адекватные экспериментальные методы для верификации теоретически предсказанных замен. Все проведенные эксперименты имели необходимые контроли. Выводы и рекомендации диссертационной работы корректны и в полной мере отражают полученные результаты.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 187 страницах, она содержит 21 рисунок, 10 таблиц, 4 схемы и 5 приложений. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы и список литературы.

Во введении автор обосновывает актуальность выбранного исследования, четко формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, положения, выносимые на защиту. Обзор литературы состоит из 6-ти глав, где представлена необходимая информация по исследуемой проблеме, включая характеристику транскрипционного комплекса РНК-полимеразы II, базальных факторов транскрипции, ТАТА-боксов-содержащих промоторов, SNP таких промоторов, а также генетический полиморфизм ферментов липидного обмена. Здесь детально анализируются факторы, влияющие на транскрипционную активность гена, включая ТАТА-боксы и фланкирующие их последовательности. В обзоре также представлены современные данные о структурно-функциональном взаимодействии ТАТА-связывающих белков с промотором.

Материалы и методы проведенного исследования полностью соответствуют поставленной цели и решаемым задачам. Автором была сформирована электронная библиотека из 388 неаннотированных SNPs в кор-промоторных районах 68 генов пищевого поведения человека. Для 62 генов с помощью Web сервиса SNP_TATA_Comparator было обнаружено 388 SNPs в районе их промоторов, для шести генов не было обнаружено SNPs. Из них были выбраны гены со значимым (по прогнозу) изменением сродства для дальнейшего экспериментального анализа: LEP, ABCA9, GCG, CYP2A6, TPI. Для этого Аркова О.В. использовала набор современных молекулярно-генетических методов исследования и методов биохимии. Все методы описаны достаточно детально и при желании могут быть легко воспроизведены.

В главе 3 «Результаты и обсуждение» автором представлены и проанализированы результаты собственных исследований. Проведенное экспериментальное исследование показало эффективность использования разработанного в ИЦиГ Web сервиса SNP-TATA-Comparator для предсказания новых потенциально функционально значимых мутаций ТАТА-боксов промоторов генов человека. Результаты экспериментов показали, что связывание ТАТА-связывающего белка с олигонуклеотидами, идентичными ТАТА-боксам референсных и минорных аллелей ряда генов липидного метаболизма различается в зависимости от наличия однонуклеотидной замены. Так, минимальное

увеличение сродства на 14%, оказывает мутация -30A>T (rs34104384) ТАТА-бокса промотора гена *LEP*, максимальное, в 2 раза, мутация -38G>A (rs200487063) ТАТА-бокса этого гена. Максимальное уменьшение сродства в 7 раз оказывает мутация -24T>G (rs1800202) ТАТА-бокса гена *TPI*. Экспериментальные данные коррелируют с прогнозами, сделанными с помощью разработанного Web сервиса ($r=0.89$). Изменение наследственной информации в результате мутаций в ТАТА-боксе реализуется через изменение скоростей образования и распада комплексов ТАТА-связывающего белка с ТАТА-боксами. Скорости образования изменяются в пределах от 0.2 до 14 раз. Мутация -35A>G (rs201381696) промотора гена *LEP*, нарушающая последовательность ТАТА-бокса, приводит к максимальному увеличению скорости распада комплексов - в 7 раз. Изучение в режиме реального времени образования комплексов ТАТА-связывающего белка с мечеными FRET-парой флуорофоров TAMRA и FAM олигонуклеотидами, идентичными ТАТА-боксам промоторов референсных генов *LEP* и *TPI* и их минорным аллелям, показало, что образование комплексов может происходить как по прямому пути, так и по разветвленному, через промежуточные стадии, вероятность возникновения которых возрастает с увеличением длины олигонуклеотидов и концентрации ТАТА-связывающего белка. На культуре клеток человека HCT116 показана корреляция влияния ($r=0.89$) мутаций ТАТА-боксов на сродство ТАТА-связывающего белка к ТАТА-боксам и на экспрессию репортерного гена *LUC* относительно «дикого типа» (WT): мутация -38G>A (rs200487063) ТАТА-бокса промотора гена *LEP*, повышающая сродство в 2 раза, в линии клеток HCT116 повышала экспрессию репортерного гена *LUC* в 1.5 - 1.8 раза, мутация -35A>G (rs201381596), снижающая сродство в 3 раза, снижала экспрессию в среднем в 2.5 - 3 раза; мутация -34T>G (rs28399433) ТАТА-бокса промотора гена *CYP2A6*, снижающая сродство в 4 раза, также в 4 раза снижала экспрессию репортерного гена *LUC*.

В «Заключении» Арковой О.В. проводится достаточно детальный и глубокий анализ полученных результатов в обсуждении с современными данными научной литературы. Автор заключает, что исследуемые SNPs могут рассматриваться как потенциальные кандидатные маркеры для исследования нарушений липидного обмена.

В целом, считаю, что диссертационная работа выполнена на высоком научном и методическом уровнях, а автором получены новые оригинальные результаты по функциональности генетического полиморфизма ферментов липидного обмена.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на четырех международных и Российских научных конференциях. По результатам диссертации опубликовано 10 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, из них 5 статей опубликованы в журналах, индексируемых в Web-of-Science, 9 статей - в журналах SCOPUS, в РИНЦ - 4.

Выводы диссертации соответствуют цели, задачам и основным положениям. При прочтении диссертации у меня возникли некоторые вопросы, главным образом, дискуссионного характера:

1. В работе не приводятся данных об отношении шансов, когда обсуждаются ассоциации генетического полиморфизма с метаболическими нарушениями, например, с ожирением. Между тем, эти данные усилили бы связь аллельных вариантов с каким-либо фенотипическим признаком.
2. На мой взгляд, работа содержит излишнюю информацию. Так, в обзоре литературы приведены общеизвестные данные об организации промотора и факторах транскрипции, а в главе «Результаты» повторены данные литературы о каждом исследованном гене.
3. В работе встречаются жаргоны и неудачные выражения. Так, например на стр. 16 можно прочесть: «...РНК-полимераза II (Pol II) работает со всеми белок-кодирующими генами ...», на стр. 28 – «...очевидно влияние полиморфизмов, расположенных в ТАТА-боксе и во фланках, на фенотипические признаки..», на стр. 48 – «Различные формы TPI - электрофоретические и хроматографические» или на стр. 102 – «...также роль CYP2A6 полиморфизмов в риск развития рака легких..».

Следует отметить, что приведенные выше вопросы носят, в основном, дискуссионный характер и не снижают моей высокой оценки выполненной работы.

Заключение. Диссертационная работа на тему «Изучение потенциально функционально значимых полиморфизмов ТАТА-боксов промоторов генов липидного метаболизма человека» соответствует критериям пп. 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, и представляет собой законченную научно-квалификационную работу, а ее автор Аркова Ольга Владимировна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Официальный оппонент

доктор биологических наук,
профессор, руководитель лаборатории
молекулярных механизмов
канцерогенеза Федерального
государственного бюджетного
научного учреждения «Научно-
исследовательский институт
молекулярной биологии и биофизики»
630117, Россия, г. Новосибирск,
ул. Тимакова, 2/12,
Тел. 8(383) 335-98-47
imbb@niimbb.ru
<http://niimbb.ru>

Гуляева Людмила
Федоровна

Подпись профессора Гуляевой Л.Ф.
заверяю:
Ученый секретарь, к.б.н.

Сафронова
Ольга Геннадьевна

26 декабря 2017 г.

