

## ОТЗЫВ

официального оппонента  
на диссертацию Новиковой Дарьи Дмитриевны, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук, на тему: «Поиск новых чувствительных к ауксину регуляторных элементов в промоторах генов *Arabidopsis thaliana* L.», по специальностям 03.02.07 – «Генетика» и 03.01.09 – «Математическая биология, биоинформатика»

### Актуальность темы диссертационной работы

Механизмы контроля живых организмов как для поддержания гомеостаза в нормальных условиях жизнедеятельности, так и при действии различных стрессовых факторов является предметом исследования во многих странах. Такой контроль осуществляется на нескольких уровнях: организации хроматина, транскрипции, процессинга и сплайсинга пре-мРНК, трансляции, стабильности белкового продукта и модификации белков. При этом транскрипционный контроль как один из ключевых этапов регуляции экспрессии генов, может регулироваться различными стимулами, включая и фитогормоны. В последние годы накоплен огромный багаж транскриптомных данных, который позволяет формировать списки генов, транскрипция которых индуцируется или регулируется различными стимулами. Определены и исследованы многочисленные регуляторные элементы, которые, как правило, локализованы в промоторных областях генов и задействованы в сложные механизмы регуляции транскрипции генов в ответ на действие разнообразных стимулирующих факторов. Вместе с этим в промоторных областях генов могут присутствовать и дополнительные регуляторные контексты, которые еще не идентифицированы, но функциональная роль которых в регуляции транскрипции генов может быть крайне важной. Для понимания молекулярных механизмов регуляции биологических процессов, в целом, и механизмов регуляции транскрипции генов за счет действия фитогормонов, в частности, требуется поиск новых регуляторных контекстов, с последующей экспериментальной верификацией их функциональной роли в растительной клетке. Такие исследования важны как с фундаментальной точки зрения, так и с практической. Диссертационная работа Новиковой Дарьи Дмитриевны посвящена идентификации новых ауксин-чувствительных цис-регуляторных элементов в промоторах генов растений, на примере модельного растения *Arabidopsis thaliana*, и экспериментальной верификации их функциональной роли в реализации генетической информации. Принимая во внимание вышеизложенное, актуальность этой работы не вызывает сомнения.

## Структура и содержание диссертационной работы

Диссертационная работа, в целом, написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений.

После краткого введения, в котором определены цель и задачи исследования, проведен анализ литературных источников, которые имеют непосредственное отношение к изучаемой проблеме. Обзор литературы охватывает широкий круг вопросов, а именно приводится: (1) краткое описание основных фитогормонов растений и рассматривает их основные функции; (2) детальная характеристика сигнального пути ауксина; (3) современные данные об известных цис-регуляторных элементах в промоторных областях генов, которые задействованы в передачу сигнала от ауксина; (4) описание основных теоретических и экспериментальных подходов, которые используются в исследованиях регуляции транскрипции генов эукариот, включая растения; и в заключительном разделе Дарьей Дмитриевной, на основе проведенного анализа научной литературы, по тематике работы, определены основные пути для решения поставленных научных задач в этой области исследований.

В целом обзор литературы написан хорошим языком и касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы. Весьма отраднo, что Дарья Дмитриевна при написании литературного обзора, использует не только научные результаты зарубежных коллег, но и хорошо знает и цитирует научные публикации российских исследователей. Следует отметить, что все литературные данные анализируются соискателем квалифицированно и подробно, поэтому цель и задачи, поставленные автором работы, звучат вполне убедительно.

Традиционно после обзора литературы приводится описание материалов и методов исследования. В этой главе соискателем изложены основные методические особенности и приемы работы. Использован целый арсенал классических и современных методов, применяемых в мировой практике генетических и молекулярных исследований, анализа экспрессии генов, а также подходов к *in silico* анализу больших наборов биологических текстов и экспериментальных данных. Следует отметить вполне удовлетворительную разрешающую способность избранных для работы методов и в ряде случаев их успешную модификацию с учетом специфики проводимых исследований.

Аналитическое рассмотрение Главы "Результаты и обсуждение" позволяет заключить следующее: соискателем была предпринята серия экспериментов, в

целом, спланированных на хорошем профессиональном уровне, которые позволили полностью решить поставленные в ходе работы задачи. Эта часть диссертационной работы включает два основных раздела, которые представлены подразделами.

Прежде всего, хотелось подчеркнуть, что проведенные Дарьей Дмитриевной исследования базируются на литературных данных, а также результатах, полученных в организации ранее, и сформулированных на основании этого целей и задачах исследования.

Первая часть работы связана с поиском одиночных ауксин-регуляторных элементов, обозначенных диссертантом как AuxRE, достоверно ассоциированных с ранним или поздним ответом на ауксин, используя разработанный метод ТАА (Транскриптомный Анализ Ассоциаций). В результате такого поиска соискателем идентифицировано 27 и 140 генов с разной транскрипционной активностью в позднем или раннем ответах на ауксин. При этом Дарьей Дмитриевной отмечено обогащение классического ARF-связывающего AuxRE – TGTCTC - в промоторах генов, экспрессия которых активировалась ауксином в раннем ответе, что согласуется и с результатами предыдущих исследований и может рассматриваться как свидетельство корректности биоинформатического метода ТАА. Результаты дальнейшего биоинформатического анализа о представленности выявленных одиночных AuxRE в районах связывания ряда белков, а также поиск и функциональная аннотация парных AuxRE в промоторах генов *A. thaliana* с последующим поиском регуляторных модулей, ассоциированных с ответом на ауксин позволили соискателю: (1) наряду с известными ауксин-чувствительными элементами (AuxRE) в промоторах генов *A. thaliana* предсказать новые одиночные и парные AuxRE, которые представлены в том числе и А/Т-богатыми последовательностями; (2) выявить, что регуляторные районы ауксин-чувствительных генов *A. thaliana* характеризуются композиционной сложностью, когда в непосредственной близости друг от друга расположены два и более парных AuxRE.

Поскольку диссертант выяснила, что в кластерах парных AuxRE элементы-партнеры последовательности TGTCNN выравниваются относительно друг друга, а также тот факт, что в рамках одного модуля, как правило, присутствует несколько сайтов связывания транскрипционных факторов, это послужило отправной точкой для выяснения конкурентно или синергично функционируют элементы-партнеры, и все они функциональны?

В связи с этим вполне логичными видятся дальнейшие исследования Дарьи Дмитриевны по экспериментальной верификации результатов биоинформатического анализа, и, в частности, по оценки биологической функциональности парных AuxRE,

результаты, которые представлены во второй части раздела. Выбор парных AuxRE сделан на основе степени достоверности их обогащения в промоторах ауксин-чувствительных генов и представленностью в геноме (количество промоторов, в которых они присутствуют), таким критериям соответствовали 40 парных AuxRE. Для того, чтобы выбрать парных AuxRE последовательности для оценки их функциональной роли в регуляции экспрессии генов ауксином, Дарьей Дмитриевной проведены сравнительные исследования по изменению уровня транскрипции генов, которые выбраны по результатам биоинформатического анализа и которые в промоторной области имеют целевые парные AuxRE, в разных органах и тканях – проростки, семядольные листья и корни.

Результаты проведенного сравнительного исследования позволили отобрать из общего списка гены, транскрипционная активность которых активируется или подавляется в ответ на действие аналога ауксина, а также определить, что корни обработанных растений являются подходящим объектом для функциональной оценки целевых парных AuxRE. Дальнейший сравнительный анализ изменения транскрипционной активности выбранных генов в ответ на ауксин в динамике позволил отобрать пять парных AuxRE для верификации их функциональности методом направленного мутагенеза. Для этого соискателем были получены трансгенные растения *A.thaliana*, в которых экспрессия репортерного гена контролируется нативным промотором или промотором, в котором в области локализации тестируемых AuxRE введены наборы мутаций. На основе результатов сравнительного анализа по изменению локализации и интенсивности флуоресценции репортерного белка в корнях трансгенных линий растений отобраны линии растений, несущих нативные или мутантные в области AuxRE промоторы, для которых продемонстрировано изменение этих показателей. Это промоторы генов IAA30 и GATA23. Детальный сравнительный анализ изменения транскрипционной активности в ответ на ауксин нативных и мутантных промоторов этих генов, оцененных по локализации и интенсивности репортерного белка, позволил Дарье Дмитриевне сделать следующие заключения: (1) парные AuxRE TGTCCA-4-TATTTG и TGTCTG-5-CACGTG, TTGACC-24-TGTCTG участвуют в регуляции транскрипции генов GATA23 и IAA30 ауксином; (2) мутации парного AuxRE TGTCTG-5-CACGTG приводит к активации экспрессии репортерного гена, что говорит об ингибирующей роли данного парного AuxRE в регуляции активности гена IAA30; (3) мутации парного AuxRE TTGACC-24-TGTCTG приводит к полному подавлению экспрессии репортерного гена, что свидетельствует о том, что этот парный AuxRE может отвечать за активацию экспрессии гена IAA30; (4) наличие элемента-партнера последовательности TGTCNN,

возможно, и определяет то, что одни те же последовательности TGTCNN могут обеспечивать как подавление, так и активацию транскрипции генов. Дальнейший детальный биоинформатический и экспериментальный анализ (с использованием дрожжевой одногибридной системы) промотора гена IAA30 позволил найти и верифицировать *in vivo* AuxRE сложной структуры длиной 35 п.н. и продемонстрировать, что с этим AuxRE *in vitro* связываются 23 транскрипционных фактора из разных семейств: bZip, MADS, WOX, LBD, WRKY, bHLH и одна А-ацетилтрансфераза.

Несмотря на то, что основная цель диссертационной работы - идентифицировать новые ауксин-чувствительные цис-регуляторные элементы в промоторах генов растений с последующей экспериментальной верификацией их функциональной роли – практически достигнута, соискатель ставит перед собой еще одну важную задачу. Это задача – исследовать и цис-регуляторные элементы, обеспечивающие репрессию транскрипции генов ауксином, используя в качестве модельного промотор одного из генов с доказанной ауксин-зависимой репрессией - промотор гена WOX4. Для решения этой задачи соискателем, в сотрудничестве с коллегами из университета Гейдельберга, проведена серия теоретических и экспериментальных работ, которые в итоге позволили рядом с верифицированным сайтом связывания транскрипционного фактора ARF5 предсказать и сайты связывания таких транскрипционных факторов как ANL2, FUS3 и BZR. Эти результаты позволили Дарье Дмитриевне высказать вполне логичное предположение, что возможно именно за счет наличия таких сайтов связывания рядом с последовательностью TGTCTG осуществляется негативная регуляция транскрипционной активности гена WOX4 через транскрипционный фактор ARF5 совместно с другими транскрипционными факторами, такими как ANL2, FUS3 и BZR.

#### **Степень новизны результатов научных исследований.**

Соискателем разработан и использован новый биоинформатический метод ТАА (Транскриптомного Анализа Ассоциаций), который по серии транскриптомных данных описывает разнообразие цис-элементов, систематически обогащенных в промоторах генов с дифференциальной экспрессией. Проведенные теоретические и экспериментальные исследования впервые продемонстрировали, что наличие элемента-партнера последовательности TGTCNN, может определять то, что одни те же последовательности TGTCNN могут обеспечивать как подавление, так и активацию ауксином транскрипцию генов.

Приоритетными можно назвать и результаты по подавлению экспрессии гена *WOX4* за счет связывания транскрипционного фактора ARF5 с одиночным AuxRE в промоторе этого гена.

### **Научная и практическая значимость результатов**

Диссертационная работа Дарьи Дмитриевны Новиковой совмещает в себе и фундаментальность, и практическую значимость. Полученные соискателем результаты важны для развития фундаментальных представлений о молекулярных механизмах регуляции транскрипции генов за счет действия фитогормонов. С практической точки данная работа интересна тем, что разработанный метод транскриптомного анализа ассоциаций (ТАА) может быть применен для поиска связанных с транскрипционным ответом цис-регуляторных элементов, поскольку имеет такое важное преимущество как возможность анализа данных, полученных из множества транскриптомных экспериментов, что повышает достоверность предсказаний.

### **Обоснованность и вероятность заключительных выводов и рекомендации**

Использование для исследований классических и современных биоинформатических, молекулярно-биологических и генетических методов, а также методов анализа экспериментального материала подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов, представленных в диссертационной работе Дарьи Дмитриевны, а также выносимых на защиту положений и выводов.

### **Полнота опубликованности положений и результатов диссертации**

Основные положения и результаты исследований по диссертации Дарьи Дмитриевны Новиковой опубликованы в 9 работах (в том числе в 3 статьях в зарубежных изданиях, рекомендованных ВАК). Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

### **Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе**

При аналитическом рассмотрении представленных в диссертационной работе материалов возникло ряд вопросов:

1. На основании каких соображений или данных выбраны: активное вещество (2,4-Д), его концентрация, стадия развития растений и растительный материал (проростки, семядольные листья и корни) для эксперимента по тестированию уровня транскрипции выбранных на основе биоинформатического анализа генов в ответ на ауксин (1мкМ 2,4-Д) методом количественной ПЦР в реальном времени? Например, в Таблице 1.

Использованные в работе транскриптомные данные – указано, что более чаще используют другие стадии развития растений, время обработки, концентрацию активного вещества. Тем более, что для биоинформатического анализа по идентификации генов использованы именно данные, приведенные в таблице 1. Как проводили обработку растений 2,4-Д (добавляли в жидкую среду?) и использованы ли в качестве контроля растения, необработанные 2,4-Д? Все ли исследованные гены не транскрибируются без обработки 2,4-Д, т.е. транскрипция этих генов строго индуцируется обработкой 2,4-Д? Как рассчитывали относительное количество мРНК целевого гена, по методы  $\Delta\Delta Ct$ ?

2. Не ясно, какие данные представлены на гистограмме А рисунка 10 – среднее для всех данных, полученных на корнях, листьях и проростках? В подписи к гистограмме указано - А. Гистограмма изменения экспрессии генов в ответ на ауксин при обработке целых проростков, корней, семядольных листьев экзогенным ауксином в течение 60 минут (Приложение 4).
3. На каком основании были выбраны промоторы генов GATA23 и AGP7 для проверки функциональности предсказанных AuxRE методом направленного мутагенеза? Эти гены не были включены в анализ изменения транскрипции в ответ на действие 2,4-Д в течение одного часа и в исследуемой временной динамике? (См. Таблица 8. Изменение экспрессии ауксин-чувствительных генов после обработки 2,4-Д в течение одного часа и рисунок 10 Изменение экспрессии генов, содержащих в промоторах предсказанные парные AuxRE, в ответ на ауксин (1мкМ 2,4-Д)). Какие точно мутации были сделаны в выбранных регуляторных элементах? Было правильно хотя бы кратко описать или сделать схему с указанием того, какие же именно мутации были введены в соответствующие области выбранных промоторов генов? В работе же указано только общими словами - Для проверки функциональности отобранных парных AuxRE в ответе на ауксин были сделаны и трансформированы в растения *A.thaliana* агробактериальным методом необходимые наборы генетических конструкций (см. раздел 2.7; раздел 2.8). При этом в этих разделах описаны принципы использования этих методов общими словами без четкого их описания применительно к данному исследованию. Так, из описания не ясно Какой метод трансформации растений использован в работе – floral dip, вакуумной агроинфильтрации или другой?

4. Чем был обусловлен отбор 60 линий из полученных 250 линий для проведения исследований по проверки функциональности предсказанных AuxRE – уровнем экспрессии, количеством копий или иными соображениями? В работе не указано как проведен отбор первичных трансформантов растений, оценено ли количество копий T-ДНК в геноме трансгенных линий?
5. Как было доказано, что для оценки изменения паттернов экспрессии GFP в линиях *A.thaliana* при обработке растений ауксином использованы именно гомозиготные линии растений?
6. Есть ли данные (собственные или в публикациях других исследователей) о присутствии регуляторных последовательностей AuxRE в промоторах генов, которые не ассоциированы с транскрипционным ответом на ауксин?

Это осталось в работе без пояснения или обсуждения.

По разделам диссертационной работе Дарьи Дмитриевны Новиковой имеется ряд замечаний и пожеланий, которые могут быть учтены в дальнейших работах соискателя.

Ко всем разделам диссертационной работы:

- в тексте имеются некоторые стилистические погрешности неточности и неудачные выражения, и не профессиональное использование некоторых терминов и обозначений. Например, более профессионально было бы использовать обозначения: «N- или C-концевая область белка» вместо «N- или C-терминальный»; «*Arabidopsis thaliana*» или «резушка Таля» или «Резуховидка Таля» вместо «*Arabidopsis*», и т. д.

Все замечания к работе исчерпываются выше названными, большинство из которых, видимо, следует отнести к разряду досадных неточностей в оформлении работы. Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной работы, выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне, и оставляющей, в целом, хорошее впечатление. Следует еще раз отметить правильность выбранной стратегии исследования и высокую квалификацию исполнения, что положительно характеризует самого исследователя.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация на тему «Поиск новых чувствительных к ауксину регуляторных элементов в промоторах генов *Arabidopsis thaliana* L.» по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, и представляет собой законченную научно-квалификационную работу, а ее автор, Новикова Дарья Дмитриевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.07 – «Генетика» и 03.01.09 – «Математическая биология, биоинформатика».

Официальный оппонент:  
 Доктор биологических наук,  
 Руководитель группы функциональной геномики  
 Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
 Институт физиологии растений им К.А. Тимирязева  
 Российской академии наук,  
 \_\_\_\_\_  
 Голденкова-Павлова Ирина Васильевна

«05» ноября 2019 года

Контактные данные:  
 тел. +7 (499) 678-53-56; E-mail: [irengold58@gmail.com](mailto:irengold58@gmail.com); Специальность, по которой  
 официальным оппонентом защищена диссертация: 03.01.07 – генетика

Адрес места работы:  
 127276 Российская Федерация, г. Москва, ул. Ботаническая, дом 35, Федеральное  
 государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им.  
 К.А. Тимирязева Российской академии наук, группа функциональной геномики

Подпись сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
 Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук  
 Ирины Васильевны Голденковой-Павловой удостоверяю:

Ученый секретарь  
 Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
 Института физиологии растений им К.А. Тимирязева  
 Российской академии наук,

\_\_\_\_\_ Наталья Витальевна Щербакова

«11» ноября 2019 года