

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук
(ИБГ РАН)

Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334

Тел.: (499)135-60-89, (499)135-98-84 Факс: (499)135-41-05

e-mail: info@genebiology.ru; <http://www.genebiology.ru>

ОКПО 00244660 ОГРН 1027739618037 ИНН/ КПП 7736020369/773601001

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИБГ РАН

академик Георгиев П.Г.



24 октября 2019 года

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

Новиковой Дарьи Дмитриевны «Поиск новых чувствительных к ауксину регуляторных элементов в промоторах генов *Arabidopsis thaliana* L.», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.07 – «генетика» и 01.03.09 – «математическая биология, биоинформатика».

Актуальность исследования.

Фитогормоны играют ключевую роль в развитии растений, поскольку отвечают за множество физиологических процессов протекающих в растительной клетке. Ауксин – один из ключевых фитогормонов. Он обеспечивает деление клеток, может вызывать изменение направления дифференциации клеток, отвечает за эффект апикального доминирования и вовлечен в процесс формирования завязи и созревания плодов. Кроме того, ауксин, в комбинации с другими активными веществами, может использоваться в агропромышленности как эффективный

гербицид. В ответ на действие ауксина изменяется профиль экспрессии тысячи генов: наряду со значительной активацией одних генов может наблюдаться репрессия других. Выявление регуляторных последовательностей ДНК и белков-партнеров, опосредующих действие фитогормона ауксин, имеет большое значение для фундаментальной науки и развития агротехники. Поэтому изучение молекулярных основ действия ауксина является одной из актуальных задач генетики растений.

Целью данной работы является идентификация цис-регуляторных элементов, ассоциированных с ответом на ауксин на основе биоинформатического анализа транскриптомных данных, и их верификация *in vivo* на *Arabidopsis thaliana*. Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**: 1. Разработка биоинформатического метода по выявлению потенциальных цис-регуляторных элементов, связанных с дифференциальной экспрессией генов; 2. Апробация метода в поиске потенциальных цис-регуляторных элементов; 3. Анализ функциональности кандидатных цис-регуляторных элементов в ответе на ауксин *in vivo* методом направленного мутагенеза *Arabidopsis thaliana* ; 4. Экспериментальная проверка связывания кандидатных цис-регуляторных элементов с транскрипционными факторами *in vitro* .

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

Изучение молекулярных основ генерации множественных ответов на ауксин в развитии растения на транскрипционном уровне, выявление новых ТФ и цис-регуляторных элементов, вовлеченных в регуляцию активности генов ауксином, открывает новые возможности для биотехнологии и сайт-направленной селекции растений, а предсказанные цис-регуляторные элементы с подтвержденной *in vivo* функциональностью могут быть использованы для создания ауксин-чувствительных репортерных конструкций.

В регуляторных областях генов, отвечающих изменением экспрессии на обработку ауксином, присутствуют ауксин-чувствительные элементы ДНК, которые связывают множество транскрипционных факторов. Большое количество таких транскрипционных факторов делает изучение механизма регуляции

экспрессии ауксин-зависимых генов долгим и трудоёмким процессом. В ходе выполнения диссертационной работы Новикова Д.Д. разработала оригинальный подход, позволяющий с помощью биоинформационных методов выявить потенциальные ауксин-чувствительные элементы ДНК в регуляторных областях генов-мишеней. Далее существование и функциональность предсказанных регуляторных элементов подтвержались автором с помощью методов молекулярной биологии и генетики.

Оценка содержания диссертационной работы.

Представленная к защите диссертация Новиковой Д.Д. оформлена по традиционному плану и содержит следующие разделы: “Введение”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты и обсуждение”, “Заключение”, “Выводы”, “Список литературы”, содержащий 176 источников, как классические, так и актуальные современные работы отечественных и зарубежных ученых.

Отдельной похвалы заслуживает оформление диссертационной работы. Она содержит большое количество иллюстраций. Рисунки чёткие, выполнены в цвете и содержат всю необходимую информацию для интерпретации результатов представленных экспериментов.

В разделе “**Введение**” соискателем раскрывается актуальность работы, ясно сформулированы цель и задачи исследования, обоснованы научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, выделены положения, выносимые на защиту, приведены публикации автора по теме диссертации, показана апробация результатов и личный вклад автора.

Обзор литературы логически разделен на две части. Первая из них посвящена описанию современных представлений о молекулярных основах действия ауксина на экспрессию генов и роли ауксин-зависимой регуляции в жизнедеятельности клетки. Подробно описаны сигнальный путь ауксина, цис-регуляторные последовательности, вовлеченные в этот процесс, и охарактеризованы различные гормоны растений. Автором не только приведена совокупность ранее опубликованных по теме работы данных, но и проведены их

тщательный анализ и сравнение. Таким образом, Новикова ДД демонстрирует глубокое знание не только своей, но и смежных областей науки.

Вторая часть обзора литературы сфокусирована на методологических аспектах изучения механизма экспрессии ауксин-зависимых генов и транскрипционных факторов, регулирующих их экспрессию. Автор подробно описывает ряд методов молекулярной биологии, которые на данный момент являются уже не новыми, а общеизвестными и широко применяемыми в большинстве современных исследований. Описание таких классических методов стоило бы перенести в раздел «Материалы и методы». В то же время, значительная часть работы Новиковой Д.Д. выполнена с помощью биоинформационных подходов. Поэтому в литературном обзоре стоило бы подробно описать принципы, на которых основываются биоинформатические расчеты и перечислить источники, обратившись к которым читатель смог бы лучше понять раздел диссертации, посвященный поиску ауксин-чувствительных элементов ДНК.

В разделе “**Материалы и методы**” содержится детальное описание использованных экспериментальных подходов. Подробные протоколы позволяют при необходимости полностью воспроизвести все эксперименты, выполненные автором в ходе работы.

Интересная и большая по объёму и количеству полученных данных работа Новиковой Д.Д. хорошо спланирована и логично выстроена. К несомненным достоинствам диссертации следует отнести разработку нового метода транскриптомного анализа ассоциаций (ТАА). Практическая ценность данного метода подтверждается тем, что на его основе впоследствии был создан и успешно применялся новый пакет программ – metaRE. В представленной диссертации автор использовал метод ТАА для предсказания не только одиночных, но и парных ауксин-чувствительных элементов ДНК. Затем для экспериментального подтверждения существования и функциональной роли предсказанных регуляторных элементов Новиковой Д.Д. были выбраны наиболее представленные в геноме последовательности с наивысшей степенью достоверности. Изначально экспрессия выбранных генов тестировалась в тканях корней, семядолях и целом проростке *A. thaliana*. Однако, поскольку анализ экспрессии в семядолях и целом

проростке привел к не однозначным результатам, автор остановился на исследовании экспрессии тестируемых генов только в тканях корней. Интересно, что анализ изменения экспрессии модельных генов в ответ на индукцию ауксином не выявил четкого разделения на ранний и поздний экспрессионный ответ. Полученный результат позволил автору сделать вывод об условности подразделения генов на различные типы на основании этого признака.

В разделе “**Результаты**” описана проведенная Новиковой Д.Д. кропотливая работа по мутированию предсказанных ауксин-чувствительных элементов в регуляторных последовательностях тестируемых генов. Автор выявила и описала не только количественные изменения в профиле экспрессии модельных генов, но также изменения паттерна экспрессии у полученных мутантов. В экспериментах присутствуют необходимые контроли. Анализ проводился в сравнении с интактной регуляторной последовательностью в присутствии и в отсутствии индукции ауксином. Однако необходимо отметить, что количественное измерение экспрессии генов предпочтительнее было бы проводить единообразно. В одних экспериментах автор использует программу ImageJ, в других количественный PCR. Обычно изменения в экспрессии тестируемых генов достаточно точно определяются хорошо зарекомендовавшим себя методом количественного PCR. Кроме того, для удобства интерпретации данных было бы хорошо нормировать экспрессию генов, контролируемых мутантными промоторами на экспрессию под контролем интактного промотора, приняв её за единицу.

Новикова Д.Д. выявила функциональную роль анализируемых последовательностей, мутация которых в одних случаях могла активировать, а в других подавлять экспрессию тестируемых генов. Кроме того, была показана роль некоторых транскрипционных факторов, которые являлись партнерами ауксин-чувствительных транскрипционных факторов и модулировали их активность. Совокупность полученных автором данных указывает на взаимозависимое функционирование регуляторных белков и необходимость комплексного исследования белковых комплексов, отвечающих за работу ауксин-зависимых генов. Также автором были проведены эксперименты по выявлению транскрипционных факторов, способных связываться с вновь найденными

последовательностями. Такие транскрипционные факторы потенциально могут быть партнерами ауксин-зависимых транскрипционных факторов, либо участвовать в изменении структуры хроматина. Обобщая результаты работы, Новикова Д.Д. предлагает модель, согласно которой в пределах не большого участка промоторной области ауксин-зависимых генов в ответ на индукцию ауксином одновременно возникают конкуренция и кооперация между различными транскрипционными факторами.

В работе Новиковой Д.Д. раздел «Результаты» совмещен с разделом «Обсуждение». По мере изложения все полученные фактические данные суммируются и всесторонне обсуждаются с учётом всех возможных интерпретаций. Сделанные автором **выводы** хорошо сформулированы, логичны, полностью подкреплены фактическим материалом и соответствуют задачам исследования. «**Заключение**» представляет собой краткий итог проделанной диссертантом.

Автореферат отражает содержание диссертации. Основные результаты диссертационной работы Новиковой Д.Д. полностью отражены в 3 статьях, опубликованных в рецензируемых международных научных журналах, входящих в перечень ВАК, и были апробированы на 9 международных и российских научных конференциях. Несмотря на сделанные в ходе анализа работы **замечания**, диссертационная работа заслуживает высокой оценки. Достоверность полученных результатов, а также обоснованность выводов работы не вызывает сомнений.

Заключение.

Анализ результатов диссертационной работы позволяет сказать, что Новиковой Д.Д. получены совершенно новые и весьма интересные данные, расширяющие современные представления о структуре и свойствах регуляторных последовательностей ауксин-зависимых генов.

По актуальности избранной темы, степени обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверности и новизне, диссертационная работа Новиковой Дарьи Дмитриевны «Поиск новых чувствительных к ауксину регуляторных элементов в промоторах генов *Arabidopsis thaliana* L.» соответствует требованиям «Положения о

присуждении ученых степеней», утверждённого Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842, предъявляемым к диссертациям, выдвигаемым на соискание учёной степени кандидата биологических наук, а её автор заслуживает присуждения искомой степени по специальности заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 03.02.07 – «генетика» и 01.03.09 – «математическая биология, биоинформатика».

Отзыв обсуждён и утверждён на межлабораторном научном семинаре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук (22.10.2019, протокол № 3).

Заведующий лабораторией Молекулярной генетики дрозофилы
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук,
доктор биологических наук, профессор РАН



Головнин Антон Клеменсович

электронная почта: agolovnin@mail.ru
адрес Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334