

ОТЗЫВ ОППОНЕНТА
на диссертацию
Дарьи Дмитриевны Новиковой

**«ПОИСК НОВЫХ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К АУКСИНУ РЕГУЛЯТОР-
НЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ПРОМОТОРАХ ГЕНОВ *ARABIDOPSIS THALIANA* L.»,**
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальностям 03.02.07 – генетика и 03.01.09 – математическая биология и биоин-
форматика.

В диссертационной работе рассмотрена одна из основных проблем регуляции активности генов растений, связанная с предсказанием и исследованием сайтов связывания транскрипционных факторов. Ключевым регулятором самых разнообразных процессов растений является фитогормон ауксин. Однако до сих пор не ясно, как ауксин обеспечивает специфическое изменение активности генов для конкретных процессов, локализованных в разных тканях и органах. Одним из объяснений является обеспечение специфичности через разные транскрипционные факторы, а также связывающиеся с ними цис-регуляторные элементы.

Представленная работа как раз и направленная на поиск и изучение цис-регуляторных элементов специфической структуры, что делает ее актуальной для изучения закономерностей регуляции транскрипционной активности генов в целом и в ответе на ауксин в частности.

Прямой поиск транскрипционных факторов и их сайтов связывания при помощи экспериментальных методов является трудозатратным и малоэффективным, поэтому для решения поставленной задачи Новиковой Д.Д. был разработан метод поиска цис-регуляторных элементов, ассоциированных с транскрипционным ответом на разные факторы. Разработанный метод позволил осуществить предсказания цис-регуляторных элементов *A. thaliana*, ассоциированных с ответом на ауксин, а также провести экспериментальную проверку биологической функциональности ряда предсказанных регуляторных элементов с последующим выявлением связанных с ними транскрипционных факторов *A. thaliana*.

Таким образом, Новиковой Д.Д. впервые был разработан метод предсказания цис-регуляторных элементов по контексту, основанный на анализе большого количества транскриптомных данных и поиске цис-элементов, перепредставленных в промоторах ауксин-чувствительных генов, взятых из разных транскриптомных экспериментов. Ею впервые была показана систематическая аккумуляция цис-элементов на промоторах ауксин-чувствительных генов, для одного из таких модулей функциональность была подтверждена *in vivo*. Такие данные в литературе отсутствуют. Впервые изучены паттерны экспрессии генов *AGP22*, *AGP7* и *ARPI* у *A. thaliana*. Кроме того, использовались классические экспериментальные методы верификации биологической активности предсказанных цис-элементов, среди которых ОТ-количественная-ПЦР, направленный мутагенез методом перекрывающихся праймеров, дрожжевая одногибридная система и др. На основании реализованных

исследований была составлена систематизированная картина ауксин-специфичной регуляции активности генов и более подробно рассмотрен механизм регуляции транскрипции гена *IAA30*.

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, результатов, заключения, выводов и списка литературы из 176 наименований.

В главе 1 приводятся литературные данные о регуляции роста и развития растений различными фитогормонами, в том числе и ауксином. Рассматривается механизм передачи сигнала от ауксина и его эволюционное формирование. Отмечаются пробелы в имеющихся знаниях об участии разных транскрипционных факторов в этом процессе, что подтверждает актуальность работы.

Также рассматриваются существующие биоинформатические и экспериментальные подходы к предсказанию и изучению цис-регуляторных элементов. Отмечается их недостаточность для решения поставленной задачи.

В главе 2 приводятся использованные автором материалы и методы, среди которых реализованный на языке R и разработанный автором метод транскриптомного анализа ассоциаций (ТАА). Для осуществления работы также использовалось и множество других методов. Стоит отметить, что в рамках работы автору успешно удалось скомбинировать биоинформатические и экспериментальные методы для достижения поставленной цели.

В главе 3 приводится разработанный соискателем ТАА метод и основные, полученные с его помощью, результаты. Метод основан на полном переборе консенсусных символьных последовательностей ДНК и анализе значимости перепредставленности каждого цис-элемента в каждом наборе данных из серии. Этот метод позволяет анализировать обогащения всех возможных последовательностей и описывать разнообразие мотивов, характеризующих регуляторные районы генов, изменяющих свою экспрессию.

Приводятся результаты апробации разработанного метода на ауксин-индуцированных транскриптомах *Arabidopsis thaliana* с подробным описанием полученных результатов и аннотацией предсказанных цис-регуляторных элементов AuxRE разной структуры, среди которых одиночные элементы, парные элементы и модули, состоящие из двух и более парных AuxRE. В ходе предсказания ауксин-ассоциированных регуляторных элементов разной структуры были выявлены как уже известные сайты связывания транскрипционных факторов -посредников в передаче сигнала от ауксина, так и абсолютно новые последовательности, роль которых остается неизвестной. Впервые было продемонстрировано обогащение А/Т-богатых последовательностей в промоторах ауксин-чувствительных генов. Соискатель подробно разбирает полученные предсказания по каждому типу элементов, приводит их аннотацию и отмечает абсолютно новые результаты.

Приводится также экспериментальная верификация полученных при помощи ТАА метода предсказаний. Автор описывает логику выбора определенных парных элементов, расположенных одиночно и в составе модуля в промоторах генов *AGP22*, *AGP7*, *GATA23*, *BRL2*, *ARP1* и *IAA30* соответственно. Первым шагом были отобраны

предсказанные парные элементы, ассоциированные с ответом на ауксин с наибольшей достоверностью. Вторым шагом автор проверил чувствительность к ауксину сорока генов, промоторы которых содержат предсказанные парные элементы из списка, полученного на предыдущем шаге. Из генов чувствительных к ауксину были выбраны еще двадцать для изучения их экспрессии в динамике, и в завершении выбрал шесть генов для дальнейшего исследования функциональности парных AuxRE *in vivo*. Функциональность трех предсказанных парных AuxRE была верифицирована *in vivo*, что является абсолютно новым, не упоминавшимся ранее результатом.

Основные положения и выводы диссертации являются обоснованными и достоверными. Достоверность полученных результатов обусловлена использованием комплексного подхода и статистической или/и фактической значимости результатов, полученных на каждом этапе. Обсуждение полученных результатов проведено логично и корректно. Выводы диссертационной работы обоснованы.

Оценивая работу в целом можно сказать, что Новиковой Д.Д. проведено большое комплексное исследование по поиску и верификации новых ауксин-чувствительных регуляторных элементов, выполненное на высоком научном уровне. Автореферат и работы, опубликованные по теме диссертации, достаточно полно отображают ее содержание.

Замечания.

1. Для диссертационной работы по специальности 03.01.09 – «Математическая биология, биоинформатика» хотелось бы, чтобы автор внимательней относился к используемым статистическим критериям. В диссертации, при упоминании используемых статистических критериев: Фишера, поправка Бонферрони, сложного критерия Фишера не дается ссылка на источник критерия, а только ссылка на другие генетические работы. На самом деле смысл критерия и, как следствие понимание его результатов, есть только в оригинальных работах. Например, при описании метода транскриптомного анализа ассоциаций используется поправка Бонферрони, которая собственно и делает этот метод оригинальным, но при этом нет ссылки на описание критерия и его смысл. А смысл ее в том, что теперь значимость критерия относится уже не к проверке отдельной гипотезы, а к проверке совокупности гипотез.

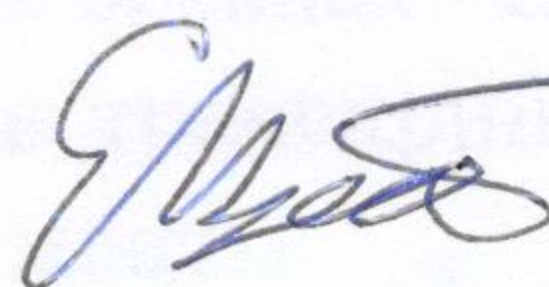
2. В диссертации не приводится ссылка на разработанную ранее в ИЦиГ СО РАН системы ExpertDiscovery, которая также как и метод транскриптомного анализа ассоциаций использует точный критерий Фишера для множественного анализа ассоциаций. Поэтому ценность диссертации больше не в методе, а в комплексной проработке совокупности применяемых методов, которая приводит к решению некоторой важной конкретной задачи, в данном случае к задаче поиска и изучения ауксин-чувствительных цис-регуляторных элементов (AuxRE) в промоторах генов. В существующих подходах к интеллектуальному анализу данных и Data Mining такие комплексные проработки, называемые стратегиями решения задач, ценятся даже больше, чем отдельные методы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сделанные замечания не умаляют значимость работы. Диссертация на тему «Поиск новых чувствительных к ауксину регуляторных элементов в промоторах генов *Arabidopsis thaliana* L.» соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 No 842, и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, 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:

Профессор, д.физ.-мат. наук,
вед.науч.сотрудник лаборатории
теории вычислимости и прикладной логики
Института математики им. С.Л. Соболева,
г. Новосибирск



Е.Е. Витяев

Почтовый адрес:

пр. ак. Коптюга, 4, 630090, г. Новосибирск, Россия
Факс: (383) 333-25-98; e-mail: im@math.nsc.ru

Подпись сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения Института математики им. Соболева Сибирского отделения Российской академии наук Евгения Евгеньевича Витяева удостоверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного учреждения Института математики им. Соболева

