

ОТЗЫВ

**официального оппонента на диссертацию Шарапова Содбо Жамбаловича
«Полногеномное исследование ассоциаций уровней N-гликозилирования белков
плазмы крови человека», представленную на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика**

Актуальность исследования

Изучение молекулярных основ регуляции механизмов реализации наследственной информации на всех уровнях, включая эпигенетические модификации хроматина, контроль процессов транскрипции и трансляции, сборку и модификации белков, представляет одну из центральных задач современной генетики в период, который часто и вполне закономерно обозначается как «постгеномный». Действительно, прогресс в технологиях секвенирования геномов дал мощный инструмент для оперативного прочтения генетической информации, в то же время процессы, которые стоят за реализацией этой информации в онтогенезе, остаются понятными лишь в самых общих чертах. Одной из причин этого, возможно, является отсутствие строгой детерминированности посттранскрипционных и посттрансляционных процессов, их зависимость от действия многообразных факторов, в отличие от законов матричного синтеза в классической структурной генетике. В этой связи, поиск генетических основ регуляции многообразия посттранскрипционных и посттрансляционных модификаций становится нетривиальной и вместе с тем актуальной задачей, сопоставимой по своим масштабам с проблемами, решаемыми генетикой количественных признаков. При этом, многообразие модификаций становится своего рода молекулярным эндофенотипом, генетическую основу которого и требуется установить.

Фокусируясь на объекте конкретной диссертационной работы – гликозилировании белков плазмы крови человека, следует подчеркнуть еще один немаловажный аспект проблемы, связанный с заметным, но возможно еще не в полной степени оцененным вкладом нарушений гликозилирования белков в этиологию одноименной группы наследственных синдромов. К настоящему времени известно более 130 врожденных болезней гликозилирования – клинически и генетически гетерогенной группы заболеваний, проявляющихся задержкой развития, неврологическими проблемами, гипотонией и рядом мультисистемных поражений органов. При этом молекулярно-генетические основы известны ещё далеко не для всех форм патологий. К тому же, используемые методы биохимической диагностики часто уступают в своей информативности подходам, основанным на детекции молекулярно-генетических изменений. Именно поэтому, идентификация новых генетических вариантов и локусов, ассоциированных с регуляцией гликозилирования белков, имеет важное научно-

практическое значение для ранней молекулярной диагностики и профилактики болезней гликозилирования, включая современные подходы, основанные на пренатальной диагностике и преимплантационном генетическом тестировании. В этой связи, диссертационное исследование, направленное на поиск таких новых генетических вариантов, представляется, несомненно, актуальным и перспективным.

Научная значимость и новизна исследования

Научная значимость и новизна диссертационной работы определяется несколькими факторами. Во-первых, в работе впервые использован метод сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии белков, позволивший существенно повысить уровень разрешения и идентифицировать ряд новых молекулярных вариантов гликанов. Кроме того, метод обеспечил и необходимую мощность полногеномного анализа ассоциаций, в совокупности с обновленными данными секвенирования популяционных выборок. Во-вторых, автором был разработан и валидирован метод гармонизации данных об уровнях N-гликанов белков плазмы крови для сопоставления результатов, получаемых в различных исследованиях. В-третьих, впервые были обнаружены ассоциации 10 локусов с уровнями гликозилирования белков, при этом для 9 из них ассоциация была подтверждена на независимых выборках. С учетом 6 локусов, известных ранее и также подтвержденных в настоящем исследовании, в общей сложности было установлено, что N-гликозилирование белков плазмы крови человека находится под контролем 15 локусов. В пределах этих 15 локусов приоритизированы и выделены гены-кандидаты, наиболее вероятно участвующие в генетической регуляции гликозилирования белков. Таким образом, проведенное исследование внесло существенный вклад в расширение представлений о генетической архитектуре процессов гликозилирования.

Структура работы, достоверность и обоснованность научных результатов

Текст диссертации построен по традиционному плану. Диссертация содержит Введение, Обзор литературы, описание материалов и методов исследования. Далее следует описание полученных результатов и отдельно выделенная глава с их обсуждением. Завершает текст диссертационной работы Заключение, за которым следуют выводы, список цитируемой литературы и приложение. Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 10 таблиц, 17 рисунков и 4 таблицы в приложении. Список литературы содержит 167 источников, при этом все они являются работами, опубликованными в зарубежной литературе. Ссылки в обзоре литературы приведены по состоянию на 2021 год.

Во Введении обосновывается актуальность исследования. Она определяется, прежде всего, недостаточностью сведений о генетических локусах, вовлеченных в контроль гликозилирования белков, полученных к тому же в более ранних исследованиях с

меньшим уровнем разрешения при измерении количественных характеристик и на менее информативных популяционных выборках для анализа геномных данных. Во Введении также приводятся данные о степени разработанности темы исследования, формулируется цель и задачи исследования, обозначается научная новизна, теоретическая и научно-практическая ценность диссертации. На защиту вынесено два положения, касающихся числа идентифицированных в настоящей работе генетических локусов, ассоциированных с популяционной изменчивостью уровней N-гликозилирования белков плазмы крови, и обозначающих новые гены-кандидаты, вовлеченные в процесс гликозилирования. В число таких генов вошли гены регуляторов транскрипции, деградации гликопротеинов, ген тяжелой цепи иммуноглобулинов и два гена с неизвестной функцией. Очевидно, что полученные в диссертационной работе основные научные результаты расширяют представления о спектре генов-кандидатов и стоящих за ними процессах, определяющих многообразие профилей гликозилирования белков. Положения представляются полностью обоснованными и подтверждаются выводами, сделанными в ходе выполнения диссертационной работы.

Обзор литературы состоит из 7 разделов, в которых последовательно раскрываются вопросы строения и биоразнообразия гликанов, их функциональной значимости как модификаторов структуры и функции белков, приводится информация о существующих подходах к систематизации и классификации многообразия вариантов гликозилирования, описываются современные представления о механизмах биосинтеза N-гликанов. Следующий блок обзора литературы посвящен рассмотрению существующих методов высокопроизводительного хроматографического определения гликозилирования белков. И наконец завершающий раздел описывает принципы и идеологию полногеномных исследований ассоциаций в изучении вопросов генетики количественных и сложно наследуемых признаков, а также приводит имеющуюся на момент начала диссертационной работы информацию о двух выполненных полногеномных ассоциативных исследованиях гликозилирования белков и об основных полученных результатах. Обзор написан прекрасным литературным языком, информативен и дает четкое представление как о степени изученности научной проблемы, так и о современных возможностях хроматографического анализа белков высокого разрешения и полногеномных ассоциативных исследований в идентификации новых участников генетического контроля реакций гликозилирования.

Глава «Материалы и методы» построена по традиционному плану и содержит исчерпывающую информацию об исследованных выборках, включающих материал 5 крупных популяционных и ассоциативных исследований TwinsUK, EPIC-Potsdam, PainOmics, SOCCS и SABRE. Учитывая наличие в этих выборках пациентов с рядом заболеваний, в частности с дорсалгией и колоректальным раком, возникает вопрос, в какой степени информация о генотипах и гликозилировании белков у таких пациентов

была использована в настоящей работе и как могла сказаться на ее результатах? Были ли установлены специфичные для отмеченных заболеваний особенности гликозилирования белков плазмы крови, что потенциально могло бы явиться диагностически значимым маркером?

Далее в главе описываются методы получения информации о гликозилировании белков с использованием технологии сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии и способы контроля качества гликомных данных. Следующим разделом идет описание методов полногеномного исследования ассоциаций, выявления новых геномных локусов, ассоциированных с различными вариантами гликозилирования белков, приводится информация о репликации результатов полногеномного исследования на независимых выборках. Завершается глава описанием методов анализа биологических путей и процессов, в которых могут быть задействованы идентифицированные в настоящем исследовании гены-кандидаты.

Основное содержание диссертационного исследования изложено в главе 3 «Результаты». Она состоит из 5 разделов. В первом из них приводятся данные о полногеномном исследовании ассоциаций, впервые проведенном в выборке TwinsUK на основе информации о спектре N-гликозилирования белков, измеренном технологией хроматографии сверхвысокого разрешения. Получены статистики ассоциаций для 113 N-гликомных признаков и более чем 8,5 млн SNP. Впервые была установлена ассоциация 10 локусов генома с уровнями N-гликанов белков плазмы крови человека, что позволило увеличить число известных локусов с 6 до 16 за счет использования более высокоразрешающей технологии измерения уровня N-гликозилирования и информативных геномных выборок. Результаты данного раздела диссертационной работы опубликованы в журнале «Human Molecular Genetics» под первым авторством соискателя ученой степени.

В следующем разделе диссертационного исследования предложен и валидирован метод гармонизации данных о гликозилировании белков, получаемых хроматографическим методом сверхвысокого разрешения в различных выборках. Предложенный подход основан на методе суммирования площадей под пиками на хроматограммах. Его использование очевидно позволило автору повысить статистическую мощность ассоциативного исследования.

Непрерывным атрибутом полногеномных исследований ассоциаций является репликация полученных результатов в независимых выборках. В настоящей работе такая репликация была проведена на материале выборок EPIC-Postdam, PainOmics, SOCCS и SABRE, которые не анализировались в ранее проведенных исследованиях гликома. Суммарно в анализ была включена информация о гармонизированных данных гликозилирования белков в 9412 образцах, для 4802 из которых были также доступны сведения о генотипах. Для каждого из 16 идентифицированных локусов были выбраны

маркирующие SNP, ассоциированные с признаком с наименьшим уровнем значимости. В результате мета-анализа, генетическая ассоциация была подтверждена для 15 из 16 локусов, что в целом свидетельствует о высоком уровне достоверности результатов, полученных в ходе полногеномного ассоциативного исследования. Таким образом было доказано, что популяционная изменчивость уровней N-гликанов, связанных с белками плазмы крови человека, контролируется, как минимум, 15 локусами генома, 9 из которых были впервые определены в настоящей диссертационной работе. Результаты репликационного исследования опубликованы в журнале «Glycobiology» за первым авторством соискателя ученой степени.

Следующим разделом исследования явилась приоритизация генов-кандидатов в идентифицированных ассоциированных геномных локусах. В результате работы были приоритизированы 24 новых гена-кандидата, предположительно участвующие в реакциях гликозилирования белков. Важно отметить, что для некоторых из этих генов-кандидатов, в частности *B4GALTI*, кодирующему галактозилтрансферазу, уже получены данные о связи с врожденным синдромом гликозилирования, тип II_d, с аутосомно-рецессивным наследованием (OMIM #607091). Для еще одного гена – *RUNX3* установлена ассоциация снижения его экспрессии с плоскоклеточным раком пищевода (OMIM #133239), а для гена *IKZF1* (7p12.2) известна ассоциация с острой лимфобластной лейкемией (OMIM #613067). Миссенс-мутации в гене *SMARCB1*, кодирующем субъединицу хроматин-ремоделирующего фактора SWI/SNF, являются этиологической основой синдрома Коффина-Сириса (OMIM # 614608), проявляющегося умственной отсталостью, тяжелой задержкой психомоторного развития, отсутствием речи, эпилепсией. На мой взгляд, идентификация в настоящем исследовании таких генов-кандидатов является одним из наиболее существенных и важных результатов диссертационной работы, расширяющих представления о спектре эффектов гликозилирования белков и их вовлеченности в патогенез различных групп наследственных и онкологических заболеваний. Иными словами здесь уместно сказать о плейотропном эффекте выявленных генов-кандидатов, реализуемом через N-гликозилирование как механизм посттрансляционной модификации белков.

Интересно, что автор также затрагивает в обсуждении своих данных вопрос о плейотропии, однако рассматривает это явление с несколько иных позиций, а именно через независимое влияние SNP как на уровень экспрессии гена, так и на фенотипический признак, который определяется данным конкретным геном. Насколько действительно, по мнению автора, такое независимое влияние может являться примером плейотропии, а не единой цепочки реализации наследственной информации от гена через его экспрессию к фенотипу? Какому типу плейотропии (см. например, Hodgkin, 1998, PMID: 9654038; Raaby, Rockman, 2013, DOI: 10.1016/j.tig.2012.10.010; Hackinger, Zeggini, 2017, DOI: 10.1098/rsob.170125) в таком случае могут соответствовать выявленные ассоциации?

Логически завершает экспериментальную часть исследования раздел, посвященный построению генной сети регуляции N-гликозилирования. Такая сеть была реконструирована на основании достоверной ассоциации 15 геномных локусов со 116 количественными признаками, характеризующими спектр N-гликозилирования белков, установленной с использованием самой крупной в мировых масштабах коллекции биообразцов с измеренными N-гликомами белков плазмы крови и определенными генотипами. Несомненно, это одно из важнейших теоретических обобщений диссертационной работы, демонстрирующее тканеспецифичность генетической архитектуры процессов гликозилирования белков. В структуре сети впервые выделено два элемента, один из которых потенциально контролирует процессы гликозилирования в гепатоцитах, а второй в В-лимфоцитах, секретирующих антитела. Результаты данного фрагмента исследования опубликованы в таких ведущих журналах, как «Nature Communications» и «Science Advances».

Основные результаты диссертационной работы представлены в разделах «Обсуждение» и «Заключение», в которых структурированно, компетентно и в то же время лаконично подводятся итоги проведенного исследования. По итогам работы сформулировано 4 вывода, содержание которых полностью обосновано.

Заключение о научно-практической ценности работы и соответствии ее требованиям ВАК

Представленная на отзыв диссертация является самостоятельным завершенным научным квалификационным исследованием. В работе присутствует внутренняя логика, развивающаяся от формулировки научной проблемы, постановки задач, разработки собственных алгоритмов их решения, получения экспериментальных данных, которые взаимно дополняя друг друга, в конечном итоге расширяют представления о генетических механизмах гликозилирования белков, как одного из вида их посттрансляционной модификации. Основные результаты диссертационного исследования опубликованы в таких авторитетных изданиях, как «Nature Communications», «Science Advances», «Human Molecular Genetics», «Glycobiology» а также обсуждены на ведущих генетических и биохимических научных форумах международного и национального уровня, включая конференции Европейского общества генетиков человека, Международную конференцию по количественной генетике, VI Съезд биохимиков России. Автореферат диссертации в полной степени отражает содержание проведенных исследований.

Таким образом, диссертация Шарاپова С.Ж. на тему «Полногеномное исследование ассоциаций уровней N-гликозилирования белков плазмы крови человека» по своей актуальности, новизне, объему проведенных исследований, научной и практической значимости полученных результатов полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, в

соответствии с п. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 № 842, а ее автор – Шарапов Содбо Жамбалович, несомненно, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Заместитель директора по научной работе
ФГБНУ «Томский национальный исследовательский
медицинский центр Российской академии наук»,
руководитель лаборатории онтогенетики
Научно-исследовательского института
медицинской генетики Томского НИМЦ
доктор биологических наук (03.02.07 – генетика),
профессор РАН

 И.Н. Лебедев

11.04.2022

Сведения об официальном оппоненте:

Лебедев Игорь Николаевич, доктор биологических наук (03.02.07 – генетика), профессор РАН, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», руководитель лаборатории онтогенетики Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского НИМЦ 634050, г. Томск, пер. Кооперативный, д. 5. Тел. 8 (3822) 51-11-09; e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru

Подпись И.Н. Лебедева заверяю
Ученый секретарь ФГБНУ «Томский национальный
исследовательский медицинский центр
Российской академии наук», к.б.н.



И.Ю. Хитринская