

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

на диссертационную работу **Драчковой Ирины Альбертовны**

«Влияние ассоциированных с наследственными заболеваниями однонуклеотидных  
замен в тата-боксах на взаимодействие с ТАТА-связывающим белком»,  
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по  
специальности 03.01.03 – молекулярная биология

**Актуальность исследования.** Выявление однонуклеотидных замен (SNPs) в геноме человека является одним из активно развивающихся направлений современной молекулярной биологии и генетики. Многочисленные исследования показали, что во многих случаях такие замены ведут к изменению функции белка и, как следствие, развитию патологий человека. Кроме этого, SNP могут затрагивать регуляторную область гена, что может вести к изменению его экспрессии. Однако эта область исследования остается малоизученной. Между тем, такие изменения могут также вносить существенный вклад в развитие патологий человека. В диссертационной работе Драчковой Ирины Альбертовны поставлена задача выявить функционально значимые SNP в сайте связывания ТАТА-связывающего белка (TATA-binding protein, TBP) и их влияние на способность взаимодействовать с белками TBP. Для решения поставленной задачи автором использовались как биоинформатические, так и экспериментальные методы. Важно отметить, что применение такого подхода вносит существенный вклад не только в наше понимание роли SNPs в развитии патологий, но и молекулярных механизмов патологических процессов. Поэтому поставленная в диссертационной работе Драчковой Ирины Альбертовны цель выявить функционально значимые SNP в сайте связывания ТАТА-связывающего белка является актуальной и своевременно поставленной проблемой.

**Научная новизна** представленной диссертационной работы не вызывает сомнения, так как многие результаты были получены впервые. Впервые показано, что функционально значимые SNPs в сайтах связывания TBP вызывают изменения аффинности взаимодействия TBP/ТАТА, связанные с изменением скоростей ассоциации и диссоциации данных комплексов, а эти изменения соответствуют фенотипическим проявлениям заболеваний. В работе также впервые показаны

функциональные различия во взаимодействии с ТРВ консенсусного ТАТА-бокса, ТАТА-подобного элемента и ТАТА-несодержащей последовательности.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Выполненное исследование, без сомнения, имеет теоретическую значимость. В ходе исследования автором были дополнены функциональные характеристики сайтов связывания ТРВ. Автором было показано, что для консенсусных ТАТА-боксов с последовательностью ТАТАWAWR характерна  $k_a$  размерностью  $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ , для ТАТА-подобных элементов  $k_a$  составляла  $10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ , а для ТАТА-несодержащих последовательностей –  $k_a$  была  $10^3 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ . Эти результаты важны для понимания функциональной роли исследуемых SNP. Результаты диссертационной работы имеют также практическую значимость. Был создан web-сервис SNP\_TATA\_COMPARATOR <http://beehive.bionet.nsc.ru/cgi-bin/mgs/tatascan/start.pl>, позволяющий оценивать сродство промоторной области генов человека (-20-70) к ТРВ. Сервис работает с последовательностями из базы данных Gencode и позволяет сравнивать каноническую последовательность референсного генома и индивидуальную последовательность пациента, несущую замену, что может быть использовано для доклинической проверки SNPs ТАТА-боксов на функциональную значимость.

**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. Все эксперименты, проводимые автором с привлечением современных экспериментальных методов генетики и молекулярной биологии, имели адекватные контроли. Выводы и рекомендации диссертационной работы корректны и в полной мере отражают полученные результаты.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 186 страницах, она содержит 20 рисунков и 7 таблиц. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы и список литературы, который включает 352 ссылки.



Во введении автор обосновывает актуальность выбранного исследования, четко формулирует цель и задачи исследования, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы состоит из нескольких глав. Здесь представлена информация о строении промоторов генов II класса, Кор-промоторе фокусированных промоторов, строении ТАТА-связывающего белка, сборке преинициаторного комплекса на TFIID-зависимых промоторах. Автор также уделяет внимание анализу и распознаванию ТАТА-боксов, взаимодействию TBP с ТАТА-боксами, включая вариабельность -30 района и регуляторный потенциал.

Автор справедливо отмечает, что комбинация новых биоинформатических методов изучения ТАТА-боксов, в том числе, пошаговой модели связывания, со всесторонним экспериментальным анализом взаимодействия TBP-ТАТА в свете современных представлений о роли TBP в функционировании кор-промотора, открывает новые возможности в нашем понимании механизмов взаимодействия TBP с -30 районом промоторов генов человека.

Материалы и методы проведенного исследования полностью соответствуют поставленной цели и решаемым задачам. Для проведения экспериментов автор использовала полноразмерный TBP человека с природной аминокислотной последовательностью, экспрессированный в клетках *E. Coli*. Для анализа сайтов связывания TBP использовали метод расширенного консенсуса по ИЮПАК TATAWAWR и позиционно-весовую матрицу Бухера. Для проведения экспериментов использовались двуцепочечные, меченые  $^{32}\text{P}$  ODN, идентичные референсным и минорным аллелям ТАТА-боксов генов человека. Для вычисления равновесных констант диссоциации,  $KD$ , комплексов TBP/ODN использовался метод равновесного связывания с последующим анализом методом количественного EMSA. Для определения константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и константы скорости диссоциации ( $k_d$ ) комплексов TBP/ODN использовался метод неравновесного связывания с последующим анализом методом количественного EMSA. Кинетический анализ взаимодействия TBP/ТАТА проводился методом поверхностного плазмонного резонанса на биосенсоре ProteOn XPR36.

В главе «Результаты и обсуждение» представлены результаты собственных исследований, где последовательно приводятся этапы проведения экспериментов с последующим обсуждением. На первом этапе исследования Драчкова И.А. создала коллекцию аннотированных SNPs в сайтах связывания TBP, для которых показана возможность участия в формировании наследственной предрасположенности человека к различным заболеваниям. Был проведен анализ последовательностей ТАТА-боксов с помощью метода *in silico* с использованием уравнения пошагового связывания и прогноза влияния SNP на аффинность TBP/ТАТА. Автором проанализированы промоторы ряда генов с различной аффинностью связывания TBP с ТАТА боксом. Следующим логичным шагом исследования было экспериментальное определение равновесной константы диссоциации ( $KD$ ) TBP с олигонуклеотидами, идентичными референсным и минорным аллелям ТАТА-боксов генов человека. В итоге было выбрано 11 генов, предсказанное изменение аффинности для которых было статистически достоверным и выше, чем типичная погрешность определения равновесной константы диссоциации  $KD$  методом равновесного связывания и задержки ДНК в геле. Далее была проведена статистическая обработка экспериментальных данных и оценка соответствия прогнозов изменения аффинности TBP *in silico* экспериментальным данным *in vitro*. Для понимания причин изменения аффинности TBP к ТАТА-боксам, содержащим замены, были проведены эксперименты по связыванию TBP с олигонуклеотидами в неравновесных условиях. На заключительном этапе исследования было проведено экспериментальное определение кинетических параметров взаимодействия (константы скорости ассоциации  $k_a$  и константы скорости диссоциации  $k_d$ ) TBP с олигонуклеотидами, идентичными референсному и минорному аллелям ТАТА-бокса гена *NOS2A* в режиме реального времени на биосенсоре ProteOn XPR36. Итогом проведенного экспериментально-биоинформатического исследования, включавшего всесторонний анализ функционально значимых SNPs, были результаты, показавшие влияние SNPs в ТАТА-боксах на фенотипические признаки человека. Такие результаты, без сомнения, важны для проведения дальнейших исследований роли таких SNPs в развитии патологий человека.



В целом, считаю, что диссертационная работа выполнена на высоком научном и методическом уровнях, а автором получены новые оригинальные результаты о функционально значимых SNPs в TATA-боксах генов человека.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на 7 международных научных конференциях. По результатам диссертации опубликовано 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, из них 4 статьи в зарубежных журналах.

Выводы диссертации соответствуют цели, задачам и основным положениям.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

При прочтении диссертации у меня возникли некоторые вопросы, главным образом, дискуссионного характера:

1. На мой взгляд, в выводе № 1 автор не удачно использует определение «биохимическое проявление SNPs»
2. Хотелось бы знать мнение автора, насколько аффинность связывания ТВР с TATA боксом влияет на уровень экспрессии гена. Возможно ли провести такой анализ с привлечением данных транскриптомного анализа для исследуемых патологий человека?
3. В работе нет информации о степени пенетрантности исследованных SNPs в TATA-боксах генов человека с привлечением данных литературы. Между тем, такие знания усилили бы значение полученных результатов для клинической практики.

Приведенные выше вопросы носят, в основном, дискуссионный характер и не снижают моей высокой оценки выполненной работы.

**Заключение.** Диссертационная работа на тему «Влияние ассоциированных с наследственными заболеваниями однонуклеотидных замен в TATA-боксах на взаимодействие с TATA-связывающим белком» соответствует критериям пп. 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, а ее автор Драчкова Ирина

Альбертовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03– «Молекулярная биология».

**Официальный оппонент**



Гуляева Людмила  
Федоровна

доктор биологических наук,  
профессор, руководитель лаборатории  
молекулярных механизмов  
канцерогенеза Федерального  
Исследовательского Центра  
«Фундаментальная и Трансляционная  
Медицина»  
630117, Россия, г. Новосибирск,  
ул. Тимакова, 2/12,  
Тел. 8(383) 335-98-47  
[gulyaeva@niimbb.ru](mailto:gulyaeva@niimbb.ru)  
<http://niimbb.ru>

Подпись профессора Гуляевой Л.Ф.

заверяю:

Начальник отдела кадров  
ФИЦ ФТМ



Минаева  
Ольга Михайловна

1 июня 2021 г.