

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 к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертационная работа Драчковой И. А. посвящена изучению взаимосвязи между последовательностями эукариотических промоторов, содержащих ТАТА-бокс, их конформацией и связыванием с ними важнейшего регуляторного полипептида — ТАТА-связывающего белка (ТВР).

ТАТА-бокс — центральный элемент многих эукариотических промоторов, на котором происходит инициация транскрипции. Для этого с ТАТА-боксом связывается белок ТВР, который далее координирует сборку множества факторов транскрипции, необходимых для узнавания промотора РНК-полимеразой II. Без надлежащей регуляции транскрипции клетки не могли бы должным образом реагировать на сигналы и дифференцироваться. Насчитывается несколько десятков примеров мутаций в ТАТА-боксах разных генов, приводящих к развитию наследственных заболеваний человека. Однако, несмотря на всю важность процесса регуляции активности генов, ТАТА-бокс представляет собой не строго заданную последовательность, а нуклеотидный консенсус, который в некоторых позициях может варьировать вплоть до того, что некоторые связывающие ТВР промоторы не предсказываются как ТАТА-содержащие при компьютерном анализе последовательности. При связывании с ДНК белок ТВР сильно деформирует ее структуру, и считается, что на узнавание ТАТА-бокса влияет не только специфичная последовательность этого элемента, но и конформационные параметры двойной спирали. Однако общие закономерности узнавания всего многообразия ТАТА-содержащих промоторов белком ТВР остаются пока не выясненными. Таким образом, работа Драчковой И. А. вписывается в контекст мировых исследований, и ее актуальность не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Драчковой И. А. состоит из традиционных разделов: введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы, насчитывающего 352 наименования.

Обзор литературы дает подробную информацию о строении промоторов эукариотических генов, транскрибируемых РНК-полимеразой II. Освещена последовательность событий, разворачивающихся при сборке преинициаторного комплекса. Обсуждена пространственная структура белка ТВР и ее связь с взаимодействием этого белка с переменными ТАТА-боксами. Отдельная весьма интересная глава посвящена описанию

разнообразных методов, используемых в мировой литературе для предсказания ТАТА-боксов. В целом литературный обзор полностью отвечает поставленным задачам, однако, возможно, стоило бы усилить его описанием известных патологических мутаций в ТАТА-содержащих промоторов генов человека. Эта информация автором приведена в разделе «Результаты и обсуждение», но по сути она служит для обоснования смысла работы, и уместнее смотрелась бы в литературном обзоре.

Глава «Материалы и методы» содержит описание современных биохимических и биоинформатических методов, использованных в работе. Сочетание вычислительных и экспериментальных подходов придает работе особую ценность. Методы исследования описаны достаточно лаконично, и местами хотелось бы видеть больше информации. Так, не приведены сведения о качестве препарата белка ТВР (хотя бы скан окрашенного полиакриламидного геля). Формулировка «Концентрацию активного ТВР определяли титрованием ТВР в фиксированной концентрации ТАТА-содержащим ODN в возрастающей концентрации» не позволяет понять, за чем же, собственно, наблюдали при титровании — был ли это эксперимент по задержке в геле или что-то другое. При описании экспериментов по задержке в геле стоило привести ссылку на его конкретное использование с белком ТВР, поскольку некоторые описанные автором детали протокола нестандартны: обычно в ходе электрофореза используют более низкое напряжение, чем описано, при нанесении — наоборот, более высокое, а определение кинетических параметров связывания белков с ДНК из экспериментов такого рода представляет собой нетривиальную задачу. С другой стороны, вряд ли имеет смысл перечислять многочисленные ограничения (по большей части, автоматически предлагаемые программой) при совершенно типовых процедурах нелинейной регрессии в GraphPad Prism.

Раздел диссертационной работы «Результаты и обсуждение» разделен на 5 частей. В первой из них описано составление выборки ТАТА-содержащих промоторов с известными патологическими мутациями и проведено биоинформатическое предсказание влияния этих мутаций на сродство ТВР к таким промоторам с использованием прогностических алгоритмов, ранее разработанных в группе. Во второй и третьей частях работы проводится экспериментальное определение сродства ТВР к олигонуклеотидам, содержащим нормальные и патогенные последовательности ТАТА-боксов, и строится модель, описывающая корреляцию между экспериментально определенными и биоинформатически рассчитанными значениями константы диссоциации. Эта корреляция оказывается достаточно высокой, что говорит и о качестве экспериментальной работы, и о надежности прогностического алгоритма. Заключительные две части раздела

«Результаты и обсуждение» посвящены более подробному исследованию механизма связывания ТВР с нормальными и мутантными промоторами, в котором используются два независимых подхода для анализа кинетики ассоциации и диссоциации комплекса белок–ДНК и показывается, что основное влияние на аффинность оказывает процесс ассоциации.

В ходе работы соискателем составлена выборка аннотированных одонуклеотидных полиморфизмов в сайтах связывания ТВР в геноме человека, имеющих патологические последствия. Установлено, что патологические мутации в сайтах связывания ТВР в большинстве случаев снижают сродство этого белка к специфическим промоторам. Показано, что экспериментально определенные значения константы диссоциации адекватно описываются моделью пошагового связывания ТВР с ТАТА-боксом. Установлено, что снижение сродства ТВР к специфической ЛНК происходит преимущественно за счет снижения константы скорости ассоциации. Интерпретация экспериментальных результатов, предложенная автором, во всех случаях представляется вполне аргументированной. Хочется еще раз подчеркнуть, что в работе удачно сочетаются расчетные и экспериментальные методы. Подобные схемы исследования, в которых проводятся экспериментальные оценки качества теоретических моделей биологических систем, известны в мировой литературе как “benchmarking” и неопределимы для развития вычислительных методов предсказания структур и функций биологических молекул, регуляторных сетей и т. п.

Замечания к работе носят в основном редакционный характер. К сожалению, текст и оформление диссертации далеки от идеального. Текст изобилует словами, не характерными для научного стиля речи («коим», «ныне», «ибо», «неведомы», «имеет место быть»), неуместными эмоциональными фигурами («Кор-промотор — это поистине сердце экспрессии, как вдохновенно называет его Tamar Juven-Gershon в своем обзоре») и жаргонизмами («буква» для обозначения нуклеотида) Сокращенные названия единиц измерения беспорядочно даны то в английском, то в русском написании, а г. Новосибирск (как место расположения ряда компаний — производителей реактивов) — только по-английски. Признавая большой вклад д. б. н. М. П. Пономаренко в развитие математических методов предсказания структур и функций промоторов, нельзя не заметить, что три раза полностью упоминать специальность его диссертационной работы, а также то, что он пользовался программным пакетом Statistica — это некоторый перебор. Из замечаний по существу работы можно отметить то, что хотелось бы видеть какой-то анализ корреляций значений K_d , полученных разными методами — задержка в геле при анализе смесей в равновесии, кинетика ассоциации/диссоциации, измеренная методом задержки в геле, и кинетика ассоциации/диссоциации, измеренная методом поверхностного плазмонного резонанса. Также обсуждение результатов выглядит неполным без анализа положения исследуемых замен в промоторах в известных

пространственных структурах комплекса ТВР–ДНК и преинициаторных комплексов более высокого порядка.

Сделанные замечания не умаляют достоинств работы и не влияют на основные выводы, которые обоснованы и не вызывают сомнения. Работа Драчковой И. А. выполнена на высоком теоретическом и экспериментальном уровнях. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации и опубликованных автором работ по данной теме.

Работа Драчковой И. А. является завершенной в целом научно-квалификационной работой, в которой решена задача установления влияния структуры эукариотических промоторов на их взаимодействие с ТАТА-связывающим белком, имеющая существенное значение для важнейшего направления биохимии и молекулярной биологии — изучения механизмов регуляции генов и принципов ДНК-белковых взаимодействий.

Таким образом, диссертационная работа по актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости полностью соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» (утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, в редакции постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Драчкова И. А., безусловно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Заведующий лабораторией белковой инженерии
Федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего образования
«Новосибирский национальный исследовательский
государственный университет», доктор биологических
наук, доцент, профессор РАН, член-корреспондент РАН



Жарков Дмитрий Олегович

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет» (НГУ)

Адрес: 630090, Новосибирская область, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Телефон: (383) 363-40-00

Факс: (383) 363-42-80

Эл. адрес: rector@nsu.ru

Подпись Жаркова Дмитрия Олеговича заверяю

Ученый секретарь Федерального государственного
автономного образовательного учреждения высшего
образования «Новосибирский национальный
исследовательский государственный университет», к. х. н.



Тарабан Е. А.

4 июня 2021 г.