

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук Романенко Светланы Анатольевны на диссертацию Грищенко Ирины Владимировны «Исследование нестабильности экзогенных повторов (CGG)_n в клеточных моделях», представленную к защите на соискание степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология

1. Актуальность темы диссертационного исследования

Одной из актуальных и важных тем генетики человека является исследование феномена экспансии повторов в геноме. Изменению подвержены повторенные последовательности, состоящие из различных мономеров (CTG, CGG, CAG и др.), а склонность к увеличению количества триплетов может наблюдаться в различных участках гена (5'UTR, 3'UTR, кодирующая область). Увеличение количества триплетов в тракте повторов приводит к развитию нейродегенеративных заболеваний человека (болезни Хантингтона, миотонической дистрофии I и II типов, синдрому ломкой X-хромосомы и др.), для которых на сегодняшний день не предложено методов терапии, действующих на причину патологий. Ключевой проблемой этого является недостаточное понимание природы самой экспансии, что отражает актуальность изучения путей развития нестабильности повторов. Изменение количества CGG-триплетов в гене *FMR1* ведет к развитию синдрома ломкой X-хромосомы и заболеваний, ассоциированных с ломкой X-хромосомой. Несмотря на многолетние исследования в данной области и высокий уровень экспериментальных данных, феномен экспансии этого типа повтора остается малоизученным. На сегодняшний день основная гипотеза заключается в том, что нарушение репликации и репарации ДНК в течение жизни клетки способны приводить к этим изменениям.

Исследование Грищенко И.В. посвящено анализу нестабильности CGG-повтора в геноме клеток человека. В работе рассматривается гипотеза участия

транскрипции и ассоциированной с ней репарации в изменении размера тракта этого типа повтора за счет формирования альтернативных вторичных структур ДНК. Важным этапом исследования стало создание набора моделей клеточных линий, которые позволяют анализировать нестабильность повтора во время транскрипции. В связи с вышесказанным можно считать работу Грищенко И.В. актуальной в контексте проводимых в мире исследований.

2. Научная новизна

Научная новизна работы определяется тем, что приведенные результаты получены впервые, а предлагаемые выводы объясняют детали природы нестабильности CGG-повтора в гене *FMR1*. Впервые показано формирование вторичных структур ДНК, представляющих собой шпильку из четырех цепей богатых гуанином (G-квадруплексы), для повтора премутантной и мутантной длины в локусе *FRAXA*. Ранее формирование подобных структур подтверждалось в экспериментах *in vitro* на искусственно синтезированных олигонуклеотидах. Этот факт позволяет предположить, что именно G-квадруплексы являются возможным источником нестабильности за счет нарушения работы клеточных каскадов. Обнаружение автором диссертации G-квадруплексов в геноме клетки в локусе гена *FMR1* позволяет начать проведение физико-химических исследований для выявления взаимодействия этих структур и белковых комплексов, связанных с ДНК. Диссертантом впервые предложены разнообразные модельные системы для анализа нестабильности во время транскрипции. Важность создания и использования этих систем обусловлена тем, что механизм участия каскадов транскрипции и ассоциированной с ней репарации на сегодняшний день плохо изучен. Ключевым обнаруженным феноменом является склонность к сокращению количества мономеров повтора в ответ на индукцию транскрипции. Эта взаимосвязь показана впервые, и она дает объяснение наблюдаемому у пациентов соматическому мозаицизму – разбросу вариантов аллелей от крупных до нормальных внутри одного типа ткани.

3. Теоретическая и практическая значимость

Полученные данные объясняют пути изменения количества мономеров микросателлитных повторов во время процессов метаболизма ДНК. В результате работы доказан вклад транскрипции и ассоциированной с ней репарации в нестабильность. В заключительной части работы автор предлагает последовательную модель развития изменений в длине трактов повторов (CGG)_n, что позволяет провести дальнейшие исследования в данной области и установить окончательный механизм развития мутации. Полученные в ходе исследования результаты лягут в основу разработки таргетной терапии. В связи с этим, теоретическая значимость данной работы не вызывает сомнения. Кроме того исследование обладает практической значимостью благодаря тому, что разработанные модельные системы могут быть использованы в дальнейших исследованиях природы нестабильности CGG-повторов, а также в ней могут быть обнаружены закономерности в изменении копийности мономеров и для других типов повторенных последовательностей.

4. Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Основываясь на полноте изложенных материалов, тщательно проведенных экспериментах, можно заключить, что положения и выводы, представленные в работе, являются полностью обоснованными и научно достоверными. Положения, выносимые на защиту, сформулированы кратко и убедительно и отражены в соответствующих главах. Работа прошла широкую апробацию на восьми международных конференциях, а ее результаты отражены в четырех публикациях в рецензируемых изданиях из списка ВАК.

5. Общая характеристика работы

В целом, диссертационная работа выполнена на высоком научном и методическом уровнях, а Грищенко И.В. получены новые данные о природе CGG-повторов.

Во *введении* автор обосновывает актуальность выбранной темы исследования, ставит цели и задачи, приводит положения, выносимые на защиту, демонстрирует степень апробации результатов.

Обзор литературы изложен детально и становится ясно, что автор глубоко разобрался в проблематике исследования.

Первый раздел обзора посвящен заболеваниям, вызванным экспансией. Подробно проанализированы пути их патогенеза.

Альтернативные вторичные структуры ДНК и их участие в развитии нестабильности рассматриваются во втором разделе.

Третья часть литературного обзора приводит данные о путях изменения количества именно триплетов CGG, что подводит читателя к исследованию автора, изложенному в последующих главах.

Материалы и методы приведены подробно. Количество экспериментальных методик и последовательность их применения доказывает комплексный подход, примененный Грищенко И.В. в ее диссертационном исследовании. Тщательность выполнения экспериментов подтверждается их детальным описанием.

Глава *Результаты и обсуждение* разделена на несколько разделов, которые отражают логику исследования. В первом разделе автор доказывает формирование G-квадруплексов в локусе гена *FMRI*. Эти данные впервые получены на ДНК клеток и позволяют считать, что действительно эти структуры ответственны за появление нестабильности. Второй раздел посвящен поиску в данном локусе белков, ассоциированных с репарацией во время транскрипции. Обнаруженный уровень обогащённости белками CSB и ERCC2 и их связь с нестабильностью CGG-повтора говорят о вовлеченности этого пути в изменение количества триплетов тракта данного типа повтора. Важный раздел посвящен разработке генно-инженерных конструкций для создания модели экспансии. Логично описана необходимость получения всех собранных конструкций. Интересным разделом является отработка протокола наработки плазмид,

содержащих повторенную последовательность. Данные о вовлеченности транскрипции и TC-NER в нестабильность представляются крайне важными, их ценность и новизна не вызывают сомнений.

Заключение суммирует все полученные результаты и предлагает дальнейшие перспективы для исследований в данной области науки.

Выводы и выносимые на защиту положения соответствуют цели и задачам.

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы.

Принципиальных замечаний по содержанию диссертационной работы нет. При прочтении работы возникает ряд вопросов:

1. В работе показано изменение в количестве копий мономеров CGG в премутации во всех клеточных моделях. Как вы считаете, почему в ваших условиях не произошло изменения в количестве триплетов у нормы?

2. В главе Результаты, посвященной иммунопреципитации, приведены данные о взаимосвязи геликаз CSB и ERCC2 и нестабильности повтора CGG. Известно ли что-то о том, как ведут себя эти геликазы в случае других повторенных последовательностей?

К замечаниям хотелось бы отнести избыточность рассмотрения механизмов патогенеза заболеваний, вызванных экспансией повторов, в обзоре литературы.

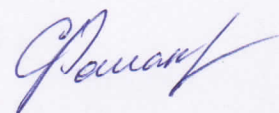
6. Заключение

Работа Грищенко И.В. является законченной научно-квалификационной работой, в которой проанализированы изменения размера CGG-повтора в модельных клеточных линиях, а также в постоянных клеточных линиях человека, кроме того показана взаимосвязь нестабильности с транскрипцией, что является важным научным выводом. Таким образом, диссертация Грищенко

Ирины Владимировны является научно-квалификационной работой. Она представляет собой законченное исследование, его тема и содержание согласуется с описанием специальности 1.5.3 – молекулярная биология. Представленная диссертационная работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени.

Официальный оппонент

доктор биологических наук, старший научный сотрудник
лаборатории цитогенетики животных
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки «Институт молекулярной и клеточной биологии
Сибирского отделения Российской академии наук»
(ИМКБ СО РАН)



Романенко Светлана Анатольевна

Юридический адрес: 630090, г. Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 8/2
Телефон: +7 (383) 363-90-42
e-mail: rosa@mcb.nsc.ru

Подпись д.б.н. Романенко С.А. заверяю:

Ученый секретарь
Федерального государственного
бюджетного учреждения науки
«Институт молекулярной и клеточной биологии
Сибирского отделения Российской академии наук»
(ИМКБ СО РАН)

к.б.н. Ахмерова Д.И.

25.05.2022

