

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук
(ИБГ РАН)

Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334

Тел.: (499)135-60-89, (499)135-98-84 Факс: (499)135-41-05

e-mail: info@genebiology.ru; <http://www.genebiology.ru>

ОКПО 00244660 ОГРН 1027739618037 ИНН/ КПП 7736020369/773601001

22.05.2023г. № 12318-136

На №

от



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИБГ РАН

академик Георгиев П.Г.

22 мая 2023 года

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Каменской Дарьи Николаевны

«Сравнительный анализ регуляторных последовательностей паралогичных генов гормона роста у лососевых рыб», представленную на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика

Актуальность темы исследования. В адаптациях и эволюции живых организмов существенное значение имеют несколько факторов: мутации, дубликации и отбор. Дубликации участков генома с последующей дивергенцией дублицированных копий традиционно считаются основным способом возникновения новых генов. После дубликаций очень небольшое количество паралогов сохраняется в неизменном виде, в то время как существенная часть копий превращается в псевдогены или приобретает новые функции. Исследование функциональных особенностей и особенностей строения дублицированных генов представляется важным для понимания их дальнейшего эволюционного пути.

Повышенный интерес к гормону роста вполне обоснован. Он выполняет ряд жизненно важных функций: отвечает за регуляцию соматического роста и участвует в многочисленных физиологических процессах, включая ионный баланс, липидный и белковый обмен, иммунный ответ, процесс размножения, а также различные аспекты поведения.

Лососевые рыбы как экономически важный промысловый объект вызывают большой интерес, но даже у таких экономически значимых видов рыб, как лососевые особенности дублированных генов гормона роста мало изучены. Приобретение новых функций должно было сопровождаться изменением механизмов регуляции экспрессии генов, что наиболее вероятно обусловлено изменениями в регуляторных элементах.

Несмотря на некоторое количество исследований, направленных на изучение структурной части генов гормона роста, регуляторные области, в том числе промоторы этих охарактеризованы остаются недостаточно изученными.

Научная новизна проведенных исследований и полученных результатов. В диссертационной работе Каменской Д.Н. впервые получены и охарактеризованы промоторные последовательности паралогичных генов гормона роста *gh1* и *gh2* у четырех видов гольцов рода *Salvelinus*. Проведен сравнительный анализ потенциальных сайтов связывания с транскрипционными факторами, расположенными в промоторной области среди представителей трех родов семейства Salmonidae: *Salvelinus*, *Salmo* и *Oncorhynchus*. Показано, что гены гормона роста у всех исследованных видов содержат одинаковый набор сайтов связывания с транскрипционными факторами. Кроме того, впервые выполненный методом скользящего окна анализ дивергенции кодирующей части генов и их промоторных участков позволил оценить уровень различий в разных сегментах двух паралогичных генов гормона роста лососевых рыб.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные данные вносят значительный вклад в понимание молекулярных основ организации промоторов генов гормона роста у лососевых рыб. Присутствие в промоторной области сайтов связывания не только с тканеспецифичными, но и с повсеместно присутствующими транскрипционными факторами, а также с рецепторами гормонов и другими лигандами указывает на возможность существования альтернативных путей регуляции транскрипции. На основе полученных данных о позициях сайтов связывания транскрипционных факторов в промоторных областях генов гормона роста можно будет планировать дальнейшие исследования, направленные на изучение роли отдельных транскрипционных факторов и их комбинаций в контроле сборки пре-инициаторного комплекса РНК полимеразы II на этих промоторах.

Нуклеотидная последовательность, состоящая из экзонов, интронов и регуляторных областей, может выступать в качестве полноразмерной генетической конструкции для генетической трансформации других видов рыб. Увеличение числа генов гормона роста в

геноме может позволить получать трансгенные линии рыб с более высокой скоростью роста в условиях аквакультуры.

Обоснованность и достоверность полученных данных. Достоверность результатов, полученных Каменской Д.Н., обеспечена современными молекулярно-генетическими методами исследования и статистической обработкой полученных данных с помощью различного программного обеспечения, которое соответствует целям и задачам, поставленным в работе. Выводы полностью основаны на результатах собственных исследований и в полной мере отвечают поставленным задачам.

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа Каменской Д.Н., изложена на 149 страницах, включает 11 таблиц и 21 рисунок, а также 4 приложения (4 стр.). Работа построена по традиционному плану и состоит из введения, четырех основных глав: «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», а также заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 188 источников, из них 176 на иностранном языке.

Во **введении** автор обосновывает актуальность исследования, освещает степень разработанности и научную новизну темы диссертационной работы. Автором корректно сформулированы цель и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту. Данный раздел диссертационного исследования находится в соответствии с выводами работы, сформулированными на основе полученных автором результатов.

Обзор литературы содержит подробную информацию об организации генов гормонов роста и их регуляторных областей у различных таксономических групп позвоночных животных от бесчелюстных до млекопитающих. Достаточно полно автор представил данные об особенностях строения гена гормона роста у рыб. Данный раздел включает информацию не только по костистым рыбам, но и по хрящевым. Описанию регуляторных участков гена гормона роста посвящен отдельный раздел, из которого видно, что в настоящее время вопросы, связанные с особенностями регуляции экспрессии паралогичных генов гормона роста лососевых рыб (дублированных генов гормона роста) изучены недостаточно, что и послужило причиной выполнения данной работы. Представленный в литературном обзоре подробный анализ литературных источников указывает на тщательную проработку автором опубликованных данных.

В главе **«Материалы и методы»** достаточно подробно описаны все этапы выполнения работы, хотя биоинформатическому анализу можно было бы уделить больше внимания. Биоинформатический анализ является ключевым для данной работы. Однако он описан всего

в 23 строках текста (разделы 2.7, 2.8). Существенно большее внимание уделяется описанию тривиальных процедур, таких, например, как получение компетентных клеток *E. Coli*.

Автором был применен широкий спектр актуальных молекулярно-генетических методов, включая молекулярное клонирование, поскольку анализ большого числа клонов увеличивает достоверность результатов, полученных в ходе эксперимента. Методы, использованные в работе, представляются адекватными поставленным задачам и соответствуют цели работы.

Глава «**Результаты**» начинается с описания полученных нуклеотидных последовательностей регуляторных участков паралогичных генов гормона роста *gh1* и *gh2* для четырех представителей гольцов рода *Salvelinus*. Автор указывает размеры полученных промоторных участков, дает обоснование почему для анализа был выбран фрагмент именно такой длины и указывает какие сайты связывания с транскрипционными факторами встречаются на данном участке промотора. Для каждого сайта связывания автор указывает границы его положения в промоторной области, нуклеотидную последовательность и отмечает имеющиеся различия внутри нуклеотидных последовательностей регуляторных элементов между видами гольцов рода *Salvelinus*. Данная информация подкрепляется схемой, на которой отмечены основные сайты связывания с транскрипционными факторами и указаны нуклеотидные последовательности с отличиями между генами *gh1* и *gh2*. В следующих разделах на основании сравнительного анализа промоторных участков и транскрибируемой части паралогичных генов гормона роста *gh1* и *gh2* четырех видов гольцов рода *Salvelinus* с другими представителями семейства Salmonidae автору удалось установить, что у всех семи исследованных видов лососевых в промоторе обоих генов содержится одинаковый набор структурных элементов, необходимых для сборки функционального транскрипционного комплекса. Оценивая уровни дивергенции с помощью метода скользящего окна, автор показал, что оба гена у лососевых достаточно консервативны, имеют небольшой уровень различий даже при сравнении видов внутри одного семейства. В промоторных областях наиболее дивергентные участки приходятся на ту часть нуклеотидной последовательности, которая не содержит сайтов связывания с транскрипционными факторами. В транскрибируемой части гена интроны показывают высокий уровень дивергенции, экзоны же остаются достаточно консервативными. Полученные данные могут указывать на сохранение функционального потенциала.

В главе «**Обсуждение**» достаточно подробно и обстоятельно проанализированы полученные результаты, что не оставляет сомнений в новизне полученных данных и содержит перспективы к дальнейшему продолжению исследований.

Заключение и выводы сформулированы грамотно, соответствуют положениям, выносимым на защиту, отражают ключевые результаты и полностью отвечают поставленным задачам и цели.

Автореферат диссертационной работы Каменской Д.Н. «Сравнительный анализ регуляторных последовательностей паралогичных генов гормона роста у лососевых рыб» соответствует содержанию диссертационной работы и оформлен в соответствии с предъявляемыми требованиями.

Замечания.

Хотя диссертационная работа в целом оставляет благоприятное впечатление, необходимо отметить ряд недостатков, которые касаются в основном изложения материала в диссертации.

1. Первые главы литературного обзора (1.1.1-1.1.3) представляют собой поверхностное изложение материала, который можно найти в любом учебнике по молекулярной биологии. К тому же они содержат ряд фактических ошибок. Например, автор пишет: "Для правильного считывания информации необходимо наличие кодонов инициации и кодонов терминации транскрипции". Таких кодонов не существует. Кодоны считываются рибосомой с РНК. Далее автор пишет о терминирующих последовательностях и указывает, что "Один тип последовательностей может распознаваться непосредственно РНК-полимеразой, другой тип – РНК-полимеразой в ассоциации с ρ -фактором". Перечисленные здесь механизмы работают только у прокариотических организмов. У эукариот сигналов терминации транскрипции в строгом смысле нет. Есть сигналы полиаденилирования. По достижении РНК полимеразой этих сигналов транскрипт разрезается и полиаденилируется, тогда как полимеразы продолжают двигаться и диссоциируют от ДНК в случайных местах. Говоря о CpG островках автор пишет: "Чаще всего они располагаются в регуляторных областях генов, но в генах человека вероятность встретить CpG островки в первых экзонах в 13 раз выше, чем в интронах...". Правильнее было бы сказать, что промоторы генов домашнего хозяйства часто располагаются в CpG-островках, которые могут включать и первые экзоны. Описывая промоторы генов гормона роста, автор указывает: "Вначале ТАТА-боксы связываются с ТАТА-связывающим белком (ТВР), который расплетает ДНК". Это неверно. Связываясь с малой бороздкой, ТВР изгибает ДНК, но не расплетает ее. Хеликазной активностью обладает фактор ТFIIN. Подобные неточности встречаются и дальше в тексте диссертации. Например, при описании собственных результатов автор пишет: "Промоторы обоих генов-паралогов содержат характерный для большинства генов эукариот высококонсервативный мотив – ТАТА-боксы...". В действительности лишь около 20% эукариотических промоторов содержат

TATA бокс. Далее, автор пишет: "3' участок обоих генов включает поли-А последовательность (ААТААА) в положениях +4137 п.н. и +3794 п.н. для gh1 и gh2 генов, соответственно". В действительности речь идет не о поли-Ф последовательности, а о сигнале полиаденилирования.

2. При изложении собственных результатов автору следовало бы аккуратнее относиться к своим утверждениям. Например, автор пишет: "Длина промоторного участка гена gh1 составила: *S. malma* – 1202 п.н., *S. curilus* – 1267 п.н., *S. levanidovi* – 1197 п.н. и *S. taranetzi* – 1207 п.н.. Длина промотора гена gh2 составила: *S. malma* – 1183 п.н., *S. curilus* – 1193 п.н., *S. levanidovi* – 1172 п.н. и *S. taranetzi* – 1193 п.н." В действительности речь идет не о длине промоторов, а о длине клонированных автором фрагментов ДНК. Никаких функциональных тестов для определения размера минимального промотора автор не проводил.

3. Также автору следовало бы подчеркивать, что речь везде идет о сайтах связывания транскрипционных факторов, которые были предсказаны на основании анализа нуклеотидной последовательности. Никаких тестов, демонстрирующих, что выявленные мотивы действительно связывают обсуждаемые транскрипционные факторы, автором не проводилось.

Как уже говорилось, сделанные выше замечания касаются скорее изложения материала в диссертации, чем существа работы.

Заключение.

Диссертация Каменской Д.Н. представляет собой законченную научно-квалификационную работу с применением современных молекулярно-генетических методов и оригинальных экспериментальных подходов. Полученные автором данные вносят существенный научный вклад в область знаний о функциональной организации генома эукариот, и в перспективе имеют важное прикладное значение для биомедицинских исследований.

Результаты работы могут быть использованы в исследованиях, касающихся изучения организации геномов и регуляции экспрессии генов, которые проводятся в Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки: Институте молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Институте цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Институте биологии гена Российской академии наук, Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, НИЦ

«Курчатовский Институт» - ИМГ. Полученные данные также могут быть использованы при составлении курсов лекций по генетике и молекулярной биологии.

Учитывая актуальность темы исследования, объем проделанной работы, высокий экспериментальный уровень исследований, а также значимость и новизну полученных данных, можно заключить, что диссертационная работа Каменской Д.Н. «Сравнительный анализ регуляторных последовательностей паралогичных генов гормона роста у лососевых рыб», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, представляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Каменская Дарья Николаевна, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика.

Отзыв заслушан и утвержден на семинаре Отдела клеточной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук (протокол № 1 от 19 мая 2023 года).

Руководитель

Отдела клеточной геномики Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института биологии гена
Российской академии наук (ИБГ РАН)


чл.-корр. РАН,

доктор биологических наук, профессор



Разин Сергей Владимирович

Адрес: 119334, город Москва, улица Вавилова, дом 34/5
Эл. адрес: sergey.v.razin@inbox.ru

ПОДПИСЬ Разин С.В.
ЗАВЕРЯЮ 
Ученый секретарь ИБГ РАН Набирошкина Е.Н.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)

Адрес: 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

Е-mail: info@genebiology.ru

Веб-сайт: <http://www.genebiology.ru>

Телефон: +7 (499) 135-60-89, +7 (499) 135-41-05

