

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Алены Дмитриевны Золотаренко «Роль транскрипционного фактора FRA1 в патогенезе псориаза», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Псориаз – хроническое воспалительное заболевание кожи с ярко выраженной аутоиммунной составляющей – встречается в разных популяциях с частотой 1-12% и своим отрицательным влиянием на качество жизни создает серьезную социальную проблему. Несмотря на большие усилия, направленные на борьбу с этим многофакторным заболеванием, его этиология остается непонятной, а сама болезнь – неизлечимой. Имеющиеся на сегодняшний день данные, полученные с использованием близнецового метода и семейного анализа, а также путем полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) указывает на важную роль генетических и эпигенетических факторов в развитии псориаза. Тем не менее, известные нарушения экспрессии генов объясняют лишь небольшую часть случаев возникновения болезни. В этой связи поиск новых генетических маркеров псориаза, а также потенциальных молекулярных мишеней для направленной терапии, которому посвящена рецензируемая диссертация, несомненно является актуальной задачей современной молекулярной генетики и медицины.

Диссертационная работа, с любовью оформленная и написанная хорошим литературным языком, изложена на 130 страницах компьютерного текста, включает 16 таблиц и 27 рисунков, а также 158 ссылок на использованные литературные источники. Диссертация построена по обычному плану и состоит из введения, обзора литературы и экспериментальной части с разделами «Материалы и методы», а также «Результаты и обсуждение», которые завершаются заключением, выводами, информативным приложением со внушительным перечнем найденных автором регуляторов транскрипции генов, дифференциально экспрессирующихся при псориазе, и, наконец, списком использованной литературы. Здесь следует отметить, что название диссертации неудачно и скрывает значительную часть ее содержания, относящегося к анализу транскриптома больных псориазом.

Во введении А.Д. Золотаренко четко формулирует цели и задачи исследования, положения, выносимые на защиту, а также поясняет свой личный вклад в выполнение диссертационной работы. Лаконично написанный обзор литературы является хорошим введением к экспериментальной части. Он знакомит читателя с молекулярно-генетическими механизмами патогенеза псориаза и ролью иммунной системы в этих

процессах. Кратко обсуждаются возможности биочиповых технологий и новых методов полногеномного секвенирования нуклеиновых кислот в изучении дифференциальной экспрессии генов на уровне транскрипции, а также структурно-функциональные особенности факторов транскрипции семейства AP-1, которые являются основными объектами исследования в заключительной части работы. В обзоре не хватает заключения, которое бы обобщило ту большую информацию, которая в нем заключена и подчеркнуло ее связь с экспериментальной частью.

Раздел «Материалы и методы» характеризует А.Д. Золотаренко как хорошего методиста-экспериментатора, владеющего современными методами изучения экспрессии генов. Автор умеет конструировать библиотеки кДНК, пригодные для массивированного параллельного секвенирования, а также детально анализировать данные, полученные этим методом. Подробно описаны цитологические, гистохимические, генно-инженерные и молекулярно-биологические методы (в том числе, количественная ПЦР в режиме реального времени и Вестерн-блоттинг), которые автор диссертации использовала для получения регулируемой сверхэкспрессии требуемых рекомбинантных генов в культивируемых клетках и количественной оценки уровня их транскрипции и трансляции.

Использованная А.Д. Золотаренко стратегия поиска новых генетических маркеров псориаза включала выявление генов, уровень транскрипции которых изменен в очагах заболевания кожи относительно нормальных тканей. Обнаружение таких генов давало бы в руки автора ключ к определению регуляторных механизмов, обеспечивающих их дифференциальную экспрессию и позволило бы найти возможных молекулярных участников этих процессов среди известных факторов транскрипции. Разработанная стратегия была реализована путем полногеномного сравнения транскриптомов измененных болезнью и нормальных участков кожи пациентов с использованием массивного параллельного секвенирования кДНК. На этом этапе исследований было обнаружено 1564 гена, экспрессия которых различалась на уровне их транскриптов и демонстрировала как повышенный, так и пониженный уровни экспрессии. Проведенный далее исчерпывающий биоинформатический анализ выявленных различий позволил А.Д. Золотаренко идентифицировать факторы транскрипции, предположительно участвующие в генерации вышеупомянутых различий, а также построить гипотетические карты сигнальных каскадов, регулирующих ключевые биохимические процессы, задействованные в псориазе: а именно, клеточную адгезию и перестройку внеклеточного матрикса, а также цитоскелета кератиноцитов и клеточный цикл.

На основании полученных результатов далее А.Д. Золотаренко делает обоснованное предположение о том, что, по крайней мере, часть обнаруженных различий

в экспрессии генов пораженных болезнью и нормальных тканей можно было бы объяснить aberrантным действием семи факторов транскрипции семейства AP-1, в частности, через изменение уровней их экспрессии. Действительно, с использованием количественной ПЦР в режиме реального времени, автору удалось продемонстрировать повышенный уровень транскриптов одного из генов этого семейства – фактора транскрипции FRA1 – у больных псориазом, что сопровождалось возрастанием внутриклеточного содержания и его белкового продукта, выявленным иммунохимическим окрашиванием тканей и Вестерн-блоттингом.

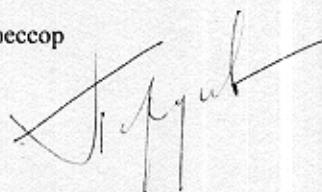
В заключительной части диссертационной работы А.Д. Золотаренко предпринимает успешную попытку обнаружения молекулярных мишеней, на которые действует вышеупомянутый фактор транскрипции FRA1 в условиях повышенной или сниженной экспрессии его гена. Для этого автор создает генно-инженерную конструкцию, которая позволила осуществлять индуцируемую экспрессию гена FRA1 в иммортализованных кератиноцитах человека, и исследует действие рекомбинантного гена на экспрессию восьми дифференциально экспрессирующихся генов, обнаруженных в ходе выполнения первой части диссертационной работы. Оказалось, что сверхэкспрессия гена FRA1 или подавление его экспрессии с помощью РНК-интерференции сопровождаются координированным усилением или ингибированием транскрипции двух генов металлопротеиназ MMP1 и MMP12, участвующих в перестройках внеклеточного матрикса, а также гена циклина A2 CCNA2.

Результаты, полученные А.Д. Золотаренко при выполнении диссертационной работы, в основном, продемонстрировали правильность выбранной стратегии поиска новых молекулярных маркеров псориаза. Обнаруженный ген фактора транскрипции FRA1 может быть таким новым потенциальным маркером-кандидатом с возможностью его использования в клинической практике. Тем не менее, в использованной стратегии, основанной на полногеномном анализе транскриптома, имеется существенный недостаток. Внутриклеточные уровни РНК, выявляемые таким методом, могут не отражать уровни транскрипции соответствующих генов, а также эффективность их трансляции. В частности, при таком подходе не учитывается стабильность РНК и возможность ингибирования ее трансляции регуляторными молекулами, например, миРНК. В этой связи представляется не совсем оправданным поиск регуляторных молекул только среди белков, оказывающих влияние на транскрипцию соответствующих генов. Не исключено, что более плодотворным хотя и более трудно реализуемым подходом к поиску маркеров псориаза мог бы стать сравнительный анализ протеома, что, конечно, потребует от исследователя других биохимических навыков и другого оборудования.

В заключение следует отметить, что автором диссертации проведена большая высококвалифицированная работа по поиску новых генетических маркеров псориаза, которая успешно завершилась обнаружением гена фактора транскрипции FRA1, с большой вероятностью ассоциированного с данным заболеванием. Следует особо подчеркнуть открытый характер проведенного исследования, которое может быть продолжено в направлении поиска других генетических маркеров псориаза среди найденных в работе дифференциально экспрессирующихся генов. В своей диссертационной работе А.Д. Золотаренко проявила себя зрелым исследователем, способным критически анализировать научную литературу, планировать эксперименты и реализовывать их с использованием современных методов молекулярной биологии и генетики. Автореферат диссертации и сделанные публикации хорошо отражают ее содержание. Выводы диссертации не вызывают сомнений. С учетом всего вышеизложенного считаю, что рецензируемая диссертация полностью отвечает всем требованиям, предъявляемым в п. №9 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. за № 842" к кандидатским диссертациям, а ее автор, А.Д. Золотаренко, несомненно заслуживает присуждения ей искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – Генетика.

Ведущий научный сотрудник лаб. биотехнологии
ФГБУН ИБХ РАН
доктор биологических наук, профессор

4 мая 2015 г.



Лев Иванович Патрушев

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

117997, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10, тел. +7 (495) 335-01-00, office@ibch.ru

Подпись в.н.с. Л.И. Патрушева удостоверяю
Ученый секретарь ИБХ РАН
доктор физ. мат. наук



Владимир Александрович Олейников