

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ИНСТИТУТ
ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ
И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ

СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИХБФМ СО РАН)

Просп. ак. Лаврентьева, 8, г. Новосибирск, 630090
тел. (383) 363-51-50
факс (383) 363-51-53
E-mail: niboch@niboch.nsc.ru
http://www.niboch.nsc.ru

"УТВЕРЖДАЮ"

Директор Федерального
государственного бюджетного
учреждения науки Института
химической биологии и
фундаментальной медицины
Сибирского Отделения РАН
академик РАН Власов В.В.

№ 15809-6215-01

На № _____



_____ 2015 г.

ОТЗЫВ

**ведущей организации на диссертацию Акопова Сергея Борисовича
«Структурно-функциональный анализ энхансерных и инсуляторных
систем регуляции транскрипции», представленную на соискание ученой
степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 –
молекулярная биология**

После определения нуклеотидных последовательностей нескольких эукариотических геномов одной из главных задач геномики становится изучение регуляторных механизмов, определяющих фенотипическое разнообразие живых организмов. На настоящем этапе понятно, что совокупность генов и регуляторных областей генома многоклеточных организмов связана в сложный регулируемый комплекс, определяющий существование многочисленных типов специализированных клеток, однако конкретные элементы этого комплекса исследованы недостаточно. Диссертационная работа Акопова С.Б. посвящена актуальной проблеме функциональной геномики - идентификации и картированию *цис*-регуляторных элементов, в частности энхансеров, инсуляторов, а также сайтов связывания транскрипционных факторов в геномах эукариот. Выполненная работа является частью масштабного проекта, проводимого в лаборатории структуры и функций генов человека ИБХ РАН, задачей которого является локализация и выяснение роли элементов генома, относящихся к различным классам функциональных последовательностей, в полигенных геномных локусах. Используемые в работе методы картирования функциональных областей генома позволяют проводить отбор специфических последовательностей из множества фрагментов в составе геномных библиотек на основании их функциональной активности.

Целью диссертационной работы С.Б. Акопова являлось развитие подходов к выявлению, функциональному картированию и функциональной характеристике *цис*-регуляторных элементов внутри протяженных областей геномов и применение этих методов для идентификации таких элементов в геномах позвоночных. Цели и задачи работы представляются весьма актуальными, а тема исследования имеет фундаментальное значение для создания функциональных карт геномов эукариот.

При выполнении работы автор поставил себе ряд задач, которые с успехом реализовал:

1. Разработана стратегия идентификации и картирования потенциальных энхансеров в протяженных областях генома. С ее помощью идентифицировано и картировано 15 потенциальных энхансеров в локусе хромосомы 19 человека между генами *FXYD5* и *COX7A1*. Показано, что потенциальные энхансеры специфически взаимодействуют с ядерными белками. 13 из 15 обнаруженных последовательностей проявляют энхансерную активность в системе экспрессии репортерного гена.

2. С помощью ранее разработанного автором метода позитивно-негативной селекции энхансер-блокирующих элементов генома идентифицировано и картировано 10 новых потенциальных инсуляторов в локусе хромосомы 19 человека. Проведен анализ энхансер-блокирующей активности обнаруженных ранее методом двумерного EMSA 10 CTCF-связывающих фрагментов ДНК. Все исследованные CTCF-связывающие последовательности проявляют энхансер-блокирующую активность в данной системе.

3. Для демонстрации универсальности разработанного автором ранее метода двумерного EMSA выявлены и картированы 77 участков области глобиновых генов кур, способных специфически связываться с фактором транскрипции CTCF. Методом иммунопреципитации хроматина показана повышенная степень связывания трех CTCF-связывающих фрагментов в клетках эритроидного типа по сравнению с лимфоидными клетками.

4. На примере LTR семейства HERV-K (HML-2) исследован потенциальный спектр регуляторных элементов, принадлежащих рассеянными по геному мобильным элементам. Показано наличие промоторной активности LTR эндогенных ретровирусов человека семейства HERV-K в клеточных линиях человека и грызунов и выявлена ее тканеспецифичность. Обнаружено, что находящийся в составе LTR регуляторный элемент, подавляющий активность его промотора, остается активным во всех линиях клеток. Показана также тканеспецифичность энхансерной активности LTR. Таким образом, установлено, что LTR HERV-K обладают уникальным пакетом тканеспецифичных регуляторных элементов.

5. Разработан метод выделения ДНК-связывающих белков и с его помощью очищены три ранее неизвестных белка ERLBF1, ERLBF2 и ERLBF3 (Endogenous Retrovirus LTR Binding Factors), образующих специфический комплекс с 5'-областью LTR HERV-K. Один из белков идентифицирован как конститутивно экспрессирующийся белок, сходный с белком теплового шока Hsc70. Полученные результаты показывают, что, по крайней мере, некоторые LTR HERV-K сохранили способность специфического взаимодействия с регуляторными белками клеток, что объясняет их функциональную активность.

За последнее время было предложено большое число различных экспериментальных подходов для идентификации регуляторных последовательностей внутри генома. Во всех этих подходах используется один и тот же ключевой элемент - получение высокообогащенных клонотек фрагментов ДНК, содержащих соответствующие регуляторные элементы. После конструирования таких клонотек нахождение их места в геноме становится чисто технической задачей и может быть осуществлено при помощи различных технологий, таких как гибридизация с геномными микрочипами, массивированное секвенирование.

В работе С.Б.Акопова было использовано детальное картирование относительно небольшого (1 млн п.о.) фрагмента хромосомы 19 человека, расположенного между генами *FXVD5* и *COX7A1*, и альфа-глобинового домена кур, которые и стали основными моделями для отработки методов идентификации регуляторных элементов.

В работе сформулирован подход к функциональному картированию геномов, заключающийся в построении подробных карт, включающих все или большую часть цис-регуляторных элементов, для относительно небольших областей генома. В дальнейшем подобные частичные карты могут быть объединены в функциональные карты целых хромосом и полных геномов. Для осуществления предложенной концепции автором разработан ряд оригинальных методов, позволяющих экспериментально идентифицировать цис-регуляторные элементы, получить клонотеки этих элементов, и определить их положение относительно друг друга и относительно генов внутри протяженных областей генома. Современные технологии полногеномного секвенирования нового поколения позволяют получить за короткое время огромный массив данных. Однако, картирование регуляторных элементов, выполненное с применением этих методов сопряжено с большим количеством ошибок. Более детальное картирование регуляторных элементов возможно с применением функционального анализа отдельных протяженных сегментов генома, что успешно удалось автору реализовать в диссертации.

Диссертация С.Б.Акопова построена по классической схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования,

изложения результатов работы и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 203 страницах, содержит 50 рисунков и 13 таблиц. Список литературы включает 448 источников. Диссертация обобщает данные 25 основных статей.

Обзор литературы диссертации написан хорошо. Автор подробно описывает функции таких регуляторных элементов, как инсуляторы, уделяет особое внимание моделям, описывающим механизм блокирования энхансеров, вопросам регуляции функционирования инсуляторов. В обзоре нашло отражение подробное изложение роли транскрипционного фактора CTCF в крупномасштабной регуляции активности генома позвоночных. К сожалению, раздел по картированию энхансеров не нашел достойного отражения в литературном обзоре. Интересно и довольно подробно написан раздел о ретроэлементах. В качестве замечания можно упомянуть, что в списке цитированной литературы статьи, опубликованные в отечественных журналах, приведены в английской транскрипции.

Глава «Результаты и обсуждение» написана очень хорошо и четко. Автором были разработаны оригинальные подходы, позволяющие идентифицировать такие регуляторные элементы, как энхансеры и инсуляторы, а оригинальная модификация метода торможения в геле ДНК-белковых комплексов позволила картировать CTCF-связывающие сайты, а так же идентифицировать ДНК-связывающие белки, образующие специфический комплекс с 5'-областью LTR HERV-K.

В качестве замечания по этой главе следует отметить использование линии клеток яичников китайского хомячка для поиска и картирования инсуляторов среди последовательностей человеческого генома, а не одну из линий клеток человека.

Сделанные замечания не умаляют положительного впечатления от работы. Автореферат полностью соответствует содержанию работы, и ее выводы обоснованы. Материалы диссертации опубликованы в рецензируемых журналах.

Диссертационная работа Аكوпова Сергея Борисовича соответствует требованиям "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 -Молекулярная биология".

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре лаборатории биохимии нуклеиновых кислот Федерального государственного бюджетного учреждения науки института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, протокол № 190 от 22.04.2015г.

Заведующая лабораторией биохимии нуклеиновых кислот
профессор, д.б.н

Зенкова М.А.

