

ОТЗЫВ

**официального оппонента
Янковского Николая Казимировича
доктора биологических наук, профессора, чл.-корр. РАН
на диссертационную работу Аكوпова 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»**

Регуляция транскрипции генов в клетках эукариот является одной из наиболее актуальных и трудных для исследования проблем современной молекулярной биологии. Проблема эта может быть подразделена на несколько направлений, таких как, поиск новых регуляторных белков и их генов и изучение механизма их взаимодействия с регуляторными последовательностями, а так же поиск и изучение регуляторных элементов непосредственно в последовательностях ДНК, подобных энхансерам, инсуляторам, сайленсерам и т.д. Оба этих пути регуляции, способные осуществлять “быструю” модуляцию активности генов, и послужили объектом исследования в представленной к защите диссертационной работе.

Целью диссертационной работы С.Б.Акопова являлось развитие подходов к выявлению, функциональному картированию и функциональной характеристике *cis*-регуляторных элементов внутри протяженных областей геномов и их применение для идентификации таких элементов в геномах человека и кур. В ходе работы были разработаны оригинальные методы поиска и идентификации таких регуляторных элементов, как энхансеры, инсуляторы, выявлены сайты связывания транскрипционного фактора CTCF и построена карта их распределения в глобиновом локусе кур, функционально охарактеризован регуляторный потенциал одиночных длинных концевых повторов (LTR) эндогенных ретровирусов человека, а также выявлены регуляторные участки связывания последовательности LTR эндогенных ретровирусов человека с белковыми факторами, выделены и охарактеризованы белки, связывающиеся с этими участками.

Работа изложена в традиционной форме и содержит главы «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение» и «Выводы».

В обзоре литературы автор обстоятельно и критически анализирует доступный на сегодняшний день обширный материал, касающийся роли энхансер-блокирующих элементов, транскрипционного фактора CTCF и ретроэлементов в регуляции экспрессии генов. Обзор состоит из трех частей. Первая часть обзора литературы посвящена описанию и обобщению основных свойств энхансер-блокирующих элементов генома, моделям и механизмам, описывающим функционирование представителей этого класса

цис-регуляторных последовательностей. В работе рассмотрен вопрос и о механизмах регуляции активности энхансер-блокирующих элементов.

Вторая часть обзора посвящена роли белка CTCF в регуляции транскрипционной активности, в частности, в проявлении энхансер-блокирующей функции инсуляторов. В работе систематизирована информация о распределении сайтов CTCF относительно генов и повторяющихся элементов генома.

Завершает обзор литературы глава, посвященная ретроэлементам, их влиянию на экспрессию клеточных генов.

Глава “Материалы и методы” содержит подробное описание разработанных либо модифицированных автором методов. Остальные методы изложены сжато и сопровождаются соответствующими ссылками.

В главе “Результаты и обсуждение” автор формулирует новые подходы к функциональному картированию протяженных областей генома, в частности, включающие в себя построение подробных карт *цис*-регуляторных элементов. Автором был разработан ряд оригинальных функциональных тестов, позволяющих экспериментально идентифицировать *цис*-регуляторные элементы и определить их положение относительно генов.

Первый раздел содержит описание оригинального метода для отбора последовательностей, проявляющих свойства энхансеров, и применения этого метода для поиска потенциальных энхансеров в локусе хромосомы 19 человека. Предложенный метод основан на хорошо известном свойстве энхансеров усиливать транскрипцию гена, придающего клеткам устойчивость к селективному агенту. Отбор потенциальных энхансеров был осуществлен из фрагментов геномной библиотеки локуса длиной 1 млн. п.о., расположенного на хромосоме 19 человека. Для этого, фрагменты библиотеки были лигированы в специально сконструированный ретровирусный вектор, содержащий ген селективного маркера, находящегося под контролем минимального промотора цитомегаловируса. Далее посредством трансфекции клеток пакующей линии Phoenix-ampho был получен набор ретровирусных частиц, которым инфицировали клетки линии HeLa. На этих этапах работы автор приводит расчеты, убеждающие в сохранении репрезентативности используемой библиотеки геномных фрагментов до стадии селекции.

В результате селекции были отобраны клетки, инфицированные конструкциями с фрагментами библиотеки, активирующими ген селективного маркера. Чтобы снизить вероятность появления ложноположительных клонов вследствие случайной интеграции конструкций в области генома, находящиеся под влиянием эндогенных клеточных энхансеров, был проведен второй раунд селекции отобранных в первом раунде фрагментов. В результате двух раундов селекции была получена библиотека потенциальных энхансеров, содержащая около 200 клонов. Исчерпывающий анализ библиотеки позволил обнаружить 15 потенциальных энхансеров, которые были секвенированы и их позиции нанесены на карту исследуемого локуса.

Пять из пятнадцати фрагментов были проверены на способность образовывать специфические ДНК-белковые комплексы с белками ядерного экстракта клеток HeLa с помощью метода сдвига электрофоретической подвижности. Все проверенные С.Б. Акоповым последовательности специфически взаимодействуют с ядерными белками *in vitro*.

Далее активность обнаруженных потенциальных энхансеров была проверена в системе двойной люциферазной детекции. Анализ показал, что 13 из 15 последовательностей проявляют энхансерную активность, усиливая экспрессию гена люциферазы, находящегося под контролем промотора SV40, от двух до пяти раз. Таким образом, большинство обнаруженных фрагментов способны активировать промотор SV40 и минимальный промотор цитомегаловируса в клетках линии HeLa, а также специфически взаимодействовать с белками ядерного экстракта HeLa *in vitro*.

В конце этой части работы автор проводит анализ расположения обнаруженных энхансеров в геноме относительно генов локуса и заключает, что большинство фрагментов расположены либо в интронах генов, либо вблизи генов, преимущественно со стороны промоторов.

Во второй части автор решает задачу поиска инсуляторов в том же локусе хромосомы 19 человека. Одним из основных свойств инсуляторов является их способность блокировать действие энхансера на промотор в том случае, когда инсулятор расположен между энхансером и промотором. На основе этого свойства ранее автором была разработана система для поиска инсуляторов в длинных геномных последовательностях, позволившая обнаружить в локусе хромосомы 19 человека восемь потенциальных инсуляторов.

В данной работе автор идентифицировал и картировал все или подавляющую часть потенциальных инсуляторов исследуемой области генома. После двух раундов позитивно-негативной селекции была получена библиотека потенциальных инсуляторов и проведен исчерпывающий анализ клонов библиотеки, позволивший обнаружить 10 новых последовательностей, которые были нанесены на карту исследуемого локуса. Далее автор анализирует их местоположение в геноме и выделяет несколько гипотетических доменов, заключенных между найденными инсуляторами.

Следующая часть работы посвящена проверке энхансер-блокирующей активности CTCF-связывающих фрагментов с помощью системы позитивно-негативной селекции. Ранее в лаборатории структуры и функций генов человека ИБХ РАН были выявлены 10 CTCF-связывающих фрагментов ДНК, расположенных на хромосоме 19 человека. Автор провел позитивно-негативную селекцию и анализ их энхансер-блокирующей активности. Все проверенные в этой системе последовательности проявляли не зависящую от ориентации фрагмента ДНК энхансер-блокирующую активность в клетках СНО.

Использование метода 2-мерного сдвига электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле, который является оригинальной модификацией известного метода торможения в геле ДНК-белковых

комплексов (EMSA), позволило автору выявить новые сайты связывания транскрипционного фактора CTCF и построить карту их распределения в глобиновом локусе кур.

Также автором приведены результаты исследования промоторной, энхансерной и сайленсерной активностей одиночного LTR семейства HERV-K(HML-2), в котором показана зависимость транскрипционной активности LTR от типа клеток. Выявлена способность специфически связываться с клеточными белковыми факторами центральной и 3'-концевой области LTR HERV-K, в частности области негативного регуляторного элемента. Показано, что в клетках, где LTR HERV-K обладает энхансерной активностью, с центральной областью LTR связывается дополнительный клеточный фактор. Была проанализирована тканеспецифичность белковых факторов, связывающихся с определённым участком длинного концевого повтора человеческого эндогенного ретровируса семейства К. Был разработан метод аффинной элюции специфических ДНК-связывающих белков с гепарин-агарозной колонки, и с его помощью выделены белки, связывающиеся с 5'-концом области U3 LTR HERV-K. Один из белков был идентифицирован и охарактеризован методами масс-спектрометрии и иммунохимии.

Замечание касается использования при селекции инсуляторных последовательностей и анализе инсуляторной активности CTCF-связывающих последовательностей геномной ДНК человека клеточной линии СНО, полученной из клеток яичников китайского хомячка. Очевидно, что часть человек-специфичных инсуляторов могла быть потеряна из-за низкой активности в клетках СНО. Кроме того могли быть отобраны последовательности, которые в действительности не являются инсуляторами человека, но проявляют свойства инсуляторов в клетках китайского хомячка. По всей видимости, выбор клеточной линии СНО в работе С.Б. Аكوпова был обусловлен техническими сложностями, однако, следовало бы проверить эти последовательности на предмет инсуляторной активности и в человеческих клетках.

Далее, некоторые инсуляторы содержали повторяющиеся элементы, что может указывать на роль этих повторов в создании доменов с независимой регуляцией генной экспрессии. Поскольку структурные и функциональные свойства таких повторов хорошо известны, автору следовало бы, на мой взгляд, более подробно обсудить механизмы проявления их инсуляторной активности. Подобный анализ способствовал бы более детальной интерпретации полученных данных и установлению специфичности наблюдаемых эффектов.

Высказанные замечания, впрочем, носят рекомендательный характер и ни в коей мере не снижают значимости предпринятых диссертантом усилий и полученных результатов. Подводя итог анализу диссертации С.Б. Аكوпова, следует заключить, что работа, несомненно, является оригинальным

экспериментальным исследованием, выполненным на высоком методическом и теоретическом уровне.

Предложенные в диссертации подходы к картированию цис-регуляторных элементов генома могут с успехом быть применены в отношении иных локусов генома человека, других высших эукариот с расшифрованными геномами, что является весьма актуальным для решения многих задач функциональной геномики.

Результаты диссертации доложены на представительных международных конференциях и отражены в публикациях в ведущих отечественных и зарубежных журналах. Их достоверность, а также обоснованность выводов работы не вызывают сомнения.

В целом диссертационная работа С.Б. Аكوпова оставляет прекрасное впечатление по объему и характеру полученных результатов, глубине понимания автором проблемы и обстоятельствам способов ее решения. По актуальности темы, новизне полученных результатов, их теоретической и практической значимости, диссертационная работа Акупова Сергея Борисовича соответствует требованиям "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденного 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.

Официальный оппонент

Янковский Николай Казимирович

Доктор биологических наук, профессор, чл.-корр. РАН

Директор Федерального государственного бюджетного

учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова

Российской академии наук

Заведующий лабораторией анализа генома

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института общей генетики им. Н.И. Вавилова

Российской академии наук

Адрес: 119991. ГСП-1, Москва, ул. Губкина, д.3

Телефон: +7(499)135-62-13, e-mail: director@vigg.ru

Подпись Н.К. Янковского заверяю:

Ученый секретарь ИОГен РАН, д. б. н.



/О.А. Огаркова/

02.04.2015г.