

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Акопова Сергея Борисовича «Структурно-функциональный анализ энхансерных и инсуляторных систем регуляции транскрипции», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук в Диссертационный совет Д 002.019.01 при ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Содержащиеся в геноме человека, а также других животных и растений десятки тысяч разнообразных регуляторных последовательностей являются основным инструментом проведения регуляции генетической активности клетки. Совокупность этих регуляторных последовательностей - энхансеров, промоторов, инсуляторов и др. представляют собой также неисчерпаемый источник «строительных блоков», необходимых для генетической инженерии, биотехнологии и генной терапии и т.д. Особый интерес в этой связи представляют регуляторные элементы, активность которых специфична для определенных тканей и органов. Идентифицированные и клонированные элементы генома могут быть использованы в качестве промоторов и энхансеров при экспрессии белков в клетках млекопитающих, при создании генетически модифицированных организмов-продуцентов биологически активных веществ, а также для направленной доставки и экспрессии терапевтических агентов в современной медицине. Таким образом, кроме очевидного фундаментального значения исследования регуляторных элементов для понимания механизмов функционирования генома, такие работы имеют и немалое практическое значение. LTR эндогенных ретровирусов, представляющие собой каскету регуляторных элементов вирусного происхождения, за миллионы лет существования в геноме млекопитающих изменились и приобрели новые свойства, необходимые для существования генома-хозяина. Регуляторные элементы LTR, как показано в работе, сохранили многие функции с одновременным расширением их разнообразия при накоплении мутаций, и

также могут служить важным источником специфичных регуляторных элементов для биотехнологии и медицины. Все вышесказанное в полной мере относится и к диссертационной работе С.Б. Аكوпова, актуальность которой, таким образом, не вызывает сомнений.

Целью диссертационной работы С.Б. Аكوпова являлась разработка экспериментальных методов идентификации регуляторных элементов внутри протяженных областей генома, а также подходов к их функциональному анализу. Автором сформулирован ряд задач по поиску и определению активности энхансеров в протяженных локусах генома человека, идентификации и картированию инсуляторов, функциональной характеристике CTCF-связывающих последовательностей, выявлению сайтов связывания транскрипционного фактора CTCF в глобиновом локусе кур, а также по функциональной характеристике LTR эндогенных ретровирусов и связывающихся с LTR белков.

Диссертационная работа С.Б. Аكوпова построена по традиционной схеме. Она состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов работы и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 203 страницах, включает 50 рисунков и 13 таблиц. Список литературы содержит 448 источников. Диссертация обобщает данные 25 основных статей автора в реферируемых журналах.

Во введении четко сформулированы цели работы, а также задачи, решение которых позволило реализовать обозначенные цели, обоснована актуальность исследования, его значимость для решения научных и практических задач, конкретно изложен авторский подход к исследованию проблемы.

Глава «Обзор литературы» состоит из трех частей и представляет собой анализ литературных источников, посвященных классификации и описанию основных свойств таких регуляторных элементов, как инсуляторы, многофункциональный фактор транскрипции CTCF и ретроэлементы.

Единственным и несущественным недостатком третьей части обзора литературы является некоторое смещение акцентов в сторону истории вопроса. Однако, в целом, обзор литературы написан хорошим научным языком, четко структурирован.

В главе “Материалы и методы” содержится подробное изложение разработанных автором либо модифицированных им методов, примененных в работе. Остальные методы приведены лаконично и сопровождаются соответствующими ссылками.

Глава “Результаты и их обсуждение” состоит из нескольких частей. В первой части предложен новый подход, позволяющий проводить поиск энхансер-подобных элементов по их способности усиливать экспрессию репортерного гена. С помощью этого метода в представленной работе были обнаружены 15 потенциальных энхансеров в локусе хромосомы 19 человека. Энхансерная активность 13 из 15 обнаруженных последовательностей была подтверждена в системе репортерного гена с помощью транзientных трансфекций. Была продемонстрирована способность обнаруженных последовательностей специфически взаимодействовать с белками ядерных экстрактов HeLa *in vitro*. Все обнаруженные в работе энхансер-подобные элементы были картированы в исследуемом локусе на хромосоме 19 человека.

Во второй части главы автор предлагает оригинальный методический подход, позволяющий проводить поиск инсуляторных последовательностей в протяженных участках генома. В качестве основного инструмента С.Б.Акоповым была создана генетическая конструкция, позволяющая проводить позитивно-негативную селекцию последовательностей, обладающих инсуляторной активностью. Предварительная позитивная селекция клонов позволила отобрать те клетки, в которых интеграция произошла в транскрипционно активных участках. Подобраны оптимальные условия электропорации для получения уникальных интеграций. По результатам негативной селекции с применением ганцикловира были отобраны последовательности, проявляющие в данной системе инсуляторную активность.

С помощью методики позитивно-негативной селекции инсуляторных последовательностей была получена библиотека потенциальных инсуляторов, исчерпывающий анализ которой выявил десять новых последовательностей, расположенных в исследуемом локусе на хромосоме 19 человека.

Третья часть главы посвящена анализу энхансер-блокирующей активности десяти обнаруженных ранее в исследуемом локусе CTCF-связывающих последовательностей. Было показано, что все десять проверенных CTCF-связывающих последовательностей проявляют энхансер-блокирующую активность в системе позитивно-негативной селекции.

В следующей части главы «Результаты и их обсуждение» использование метода двумерного сдвига электрофоретической подвижности в полиакриламидном геле позволило автору выявить новые сайты связывания транскрипционного фактора CTCF и построить карту их распределения в глобиновом локусе кур.

В последней, пятой части главы на примере LTR эндогенных ретровирусов человека семейства HERV-K исследован потенциальный спектр регуляторных элементов, принадлежащих рассеянному по геному мобильным элементам. Продемонстрировано наличие промоторной активности в разных клеточных линиях, особенно ярко выраженной в клетках Tera-1. Охарактеризован негативный регуляторный элемент (НРЭ) в составе LTR. Продемонстрировано наличие выраженной энхансерной активности у полноразмерного и частично делетированного LTR в клеточной линии Tera-1. Несомненный интерес представляют данные по исследованию тканеспецифичной активности энхансера SV-40. Автором 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. На наш взгляд определенный интерес представил бы анализ энхансерной активности LTR с делетированным промотором и НРЭ, однако это замечание не носит принципиального характера.

К числу основных достоинств работы можно отнести тщательность во всех ее проявлениях – тщательность в планировании и постановке экспериментов, тщательность в анализе полученных результатов и тщательность в формулировании выводов. Автором проделан колоссальный объем экспериментальной работы и их результаты изложены, может быть даже с излишней детализацией. 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.

В целом диссертационная работа С.Б. Аكوпова оставляет прекрасное впечатление по объему и характеру полученных результатов, глубине понимания автором проблемы и обстоятельности способов ее решения. Соискатель является автором или соавтором 25 статей в реферируемых изданиях); результаты работы были представлены также в виде докладов на международных и российских конференциях разного уровня. Количество публикаций соответствует требованиям пункта 9 «Положения о присуждении ученых степеней». Автор представляемой работы при написании диссертации ссылается на источник заимствования материала.

Естественно, в диссертационной работе содержится некоторое число опечаток, неудачных сокращений и неточностей, которые, однако, не стоит перечислять. Докторская диссертация С.Б.Акупова – весьма серьезный труд, результат многолетней работы и мелкие недочеты не могут отразиться на весьма положительной оценке работы.

Полученные результаты могут быть использованы в работах российских и зарубежных лабораторий, исследующих механизмы регуляции геномов, в частности в лабораториях ИБХ им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, НИИ ФХБ им. А.Н.Белозерского МГУ, ИМБ им. В.А.Энгельгардта РАН, ИБГ РАН, ИМГ РАН и др.

Автореферат диссертации и опубликованные статьи полностью отражают содержание диссертации. В целом, на основании вышеизложенного считаю, что диссертация Акопова Сергея Борисовича «Структурно-функциональный анализ энхансерных и инсульторных систем регуляции транскрипции», несомненно является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны положения, совокупность которых можно квалифицировать как научное достижение в области молекулярной биологии, и полностью соответствует требованиям пункта 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842, предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор, Акопов Сергей Борисович, несомненно, заслуживает присуждения ему ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология

Заведующий лабораторией молекулярных основ

действия физиологически активных соединений,

д.х.н, член-корреспондент РАН, проф.

С.Н.Кочетков

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), ГСП-1, 119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Тел. +7(499) 135-05-90 e-mail: kochet@eimb.ru

апреля 2015 г.

