

## Отзыв официального оппонента

Рыскова Алексея Петровича,

доктора биологических наук, профессора, чл.-корр. РАН,

на диссертационную работу 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.

### Актуальность исследования.

Данная работа относится к одному из направлений геномики, а именно, функциональной геномики, развитие которого основано на впечатляющих результатах по расшифровке строения генома различных организмов и, в первую очередь, генома человека. Громадный и все возрастающий объем данных по полногеномному анализу человека позволил поставить на первый план принципиально новые вопросы по функциональной значимости различных элементов генома на уровне отдельных генов, систем генов, доменных структур. На сегодняшний день информации о таких функционально значимых, в том числе, регуляторных элементах генома, определяющих специфику работы генов в разных типах клеток, крайне недостаточно, а порой она носит противоречивый характер. Значительная часть генома человека занята регуляторной информацией, на порядок или более превышающей объем информации структурных генов, что предполагает существование сложных сетей генной регуляции, когда отдельный ген обслуживается разными регуляторными элементами, а один регуляторный элемент определяет работу многих генов, в том числе, с использованием цис- и транс-молекулярных белок-белок и белок-нуклеиновая кислота взаимодействий.

Перечисленные проблемы и определяют актуальность исследования С.Б. Акопова, основной целью которой было разработка подходов к выявлению, функциональному картированию и функциональной характеристике цис-регуляторных элементов внутри протяженных областей генома. Для достижения этих целей автором сформулирован спектр задач по поиску и определению активности энхансеров в протяженном локусе хромосомы 19 человека; выявлению и картированию в этом локусе инсуляторов, в частности, CTCF-связывающих участков в этом локусе и в кластере глобиновых генов кур; функциональной характеристике LTR и связывающихся с LTR белков.

### Структура диссертационной работы.

Диссертационная работа С.Б. Акопова имеет традиционное строение и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, изложение собственных экспериментальных результатов и их обсуждение, выводы и список цитированной

литературы. Работа изложена на 203 страницах машинописного текста, содержит 24 таблицы и 30 рисунков. Список цитированной литературы включает 448 наименований научных публикаций.

В качестве недостатка я бы отметил, что необходимо было сделать еще один раздел – заключение, поскольку результаты и обсуждение объединены в одном разделе. Кроме того, неясно почему в списке цитированной литературы нет отечественных источников.

Во введении автором описана проблематика исследования, обозначена ее актуальность, отмечены вопросы, требующие своего разрешения, сформулированы подходы для решения поставленных в работе задач и более общей проблемы функционального картирования генома человека. Можно согласиться с автором о том, что «полногеномные методы исследования следует сочетать с исчерпывающим функциональным анализом отдельных протяженных сегментов генома с последующей интеграцией полученных данных в полногеномную карту регуляторных элементов». Именно в рамках этой идеологии в данной работе были проведены исследования на протяженных локусах хромосомы 19 человека и кластера глобиновых генов кур.

Однако некоторые вопросы возникают к описанию общей проблематики.

- Как «исследования генома человека позволили идентифицировать большое число транскриптов» (стр. 8)?
- В каком смысле «транскрипционный аппарат медленнее меняется в эволюции, чем цис-регуляторные элементы» (стр. 9)?

Полагаю, что это – примеры не очень четких формулировок.

Обзор литературных данных посвящен описанию элементов генома, с которыми ассоциирована функция регуляторов генной экспрессии. Описаны функциональные характеристики инсуляторов; белков, обеспечивающих их действие; механизмы регуляции функционирования; отличительные особенности видовой принадлежности. Особое внимание уделено белку CTCF как многофункциональному регулятору генной активности и возможному регулятору других регуляторов. При этом подчеркнута, что многие механизмы его функционирования остаются неизвестными, также как механизмы регуляции самого гена этого белка. Отдельный раздел посвящен ретроэлементам как носителям регуляторной информации, заложенной в LTR. Описана классификация ретроэлементов и подробно охарактеризована структура и возможные функции LTR. Обзор литературы охватывает большой объем данных, написан подробно, свидетельствует о высокой теоретической подготовке, эрудиции и компетентности автора. Следует отметить, что речь идет о весьма сложном материале, для которого многие

данные неоднозначны или требуют дополнительного разъяснения. Некоторые из них перечислены ниже.

- Каков механизм взаимодействия энхансера, инсулятора и промотора в кольцевых ДНК?
- Существуют ли структурные различия в промоторах LTR обратной ориентации между ретровирусами и интерцистернальными частицами?
- Говорится, что в геноме человека имеется 30 000 участков связывания с белком CTCF (стр. 36). Но эти участки найдены и в Alu-элементах, которых в геноме человека 1 млн. копий. Нет ли противоречия?
- Неясно, какие участки Alu могут придавать им инсуляторные свойства (стр. 41). Следует отметить два формальных недостатка:
- отсутствие абзаца в конце обзора литературы, который связывает всю эту информацию с экспериментальными задачами работы;
- вряд ли надо давать в обзоре информацию о трех белковых факторах, которые связываются с LTR, поскольку это подробно изложено в разделе Результаты.

В главе «Материалы и методы» автор приводит сведения об использованных ферментах, буферных растворах, культуральных средах, бактериальных клетках (материалы). Кратко описаны стандартные методики (со ссылками на источники) по клеточной работе, манипуляции с вирусами, приготовлению геномной библиотеки, анализу белков и т.д. Все они адекватны поставленным задачам, а более детальные, в том числе собственные разработки, представлены в следующем разделе при описании полученных результатов.

Результаты и их обсуждение даны в разделе 4, который состоит из пяти частей, посвященных энхансерам, инсуляторам, CTCF-белкам и нуклеотидным последовательностям, LTR-элементам. В каждой части автор приводит результаты масштабных исследований, направленных на идентификацию регуляторных элементов, их картирование и определение функциональных характеристик.

К основным результатам, обеспечивающим научную новизну диссертации С.Б. Акопова, следует отнести идентификацию потенциальных энхансеров и картирование новых инсуляторов в протяженном локусе хромосомы 19, выявление в кластере глобиновых генов кур участков связывания с многофункциональным белком CTCF, определение спектра регуляторных возможностей LTR-элементов. Кроме того, к важным результатам можно отнести разработку подходов для решения поставленных задач и множество конкретных сопровождающих результатов, таких как, создание специальных векторных конструкций для селекции регуляторных элементов, подробная

функциональная характеристика энхансера U2AF1L4, выявление негативного регуляторного элемента в LTR и взаимодействующих с ним тканеспецифических белков, оптимизация процедуры выделения и идентификация белковых факторов ERLBF.

К этому разделу нет серьезных замечаний, поскольку все результаты получены с высокой надежностью. Можно отметить большую перегрузку методическими деталями описание каждого результата, что затрудняет прочтение. Есть частные вопросы к некоторым методическим деталям.

- Неясно, проводили ли проверку на идентичность клонов библиотеки локуса хромосомы 13, чтобы подтвердить ее репрезентативность.
- Как доказывали сохранение репрезентативности библиотеки в составе вирусных частиц, используемых для инфицирования клеток НИЗТЗ?
- Почему для проверки энхансерной активности этого фрагмента использовали промотор SV40, а не какой-либо слабый промотор, например промотор ТК-гена вируса простого герпеса?
- Из рис. 11 следует, что энхансер U2AF1L4 находится не на 3'-конце, а в середине фрагмента, в области 200 – 260 п.н.
- Делалось ли сравнение нуклеотидных последовательностей 18 энхансер-блокирующих и 10 CTCF-связывающих фрагментов, чтобы показать их различия (стр. 118)?
- Как можно объяснить противоречие между отсутствием транскриптов и высокой промоторной активности области U5 LTR в клетках Tera-1 (стр. 134)?

Некоторые технические погрешности:

- Таблица 7 (стр. 109): подпись частично не соответствует содержанию; используются одновременно русские и английские обозначения.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов диссертационной работы.

Работа С.Б. Аكوпова выполнена на высоком научном и методическом уровне, с использованием современных методов молекулярной и клеточной биологии, генно-инженерного конструирования, компьютерного анализа, полностью адекватных для решения поставленных задач. Отличительной особенностью методической части является разработка оригинальных подходов и генных конструкций и проведение множества контрольных экспериментов. Этим определяется достоверность полученных автором результатов, которые подробно и четко описаны. Они опубликованы в 25 статьях, в том

числе, 14 зарубежных и представлены на многих зарубежных и отечественных конференциях.

Выводы работы обоснованы и соответствуют полученным результатам, целям и задачам исследования.

Автореферат дает четкое представление о полученных результатах и отражает содержание диссертации.

#### Научно-практическая значимость и рекомендации по использованию результатов.

Фундаментальная научная значимость полученных результатов связана с обнаружением и характеристикой новых регуляторных элементов в геноме человека, осуществляющих энхансерные и инсуляторные функции. Практическая значимость результатов связана с разработкой общих принципов поиска таких элементов и конкретных методик по их обнаружению и характеристике, создание оригинальных векторных конструкций и систем функционального анализа элементов. Эти разработанные или адаптированные методики могут быть использованы в молекулярно-биологических и генетических исследованиях данного профиля. Полученная научная информация может быть также использована при подготовке учебных курсов лекций по молекулярной биологии для студентов биологических факультетов ВУЗ-ов. С материалами диссертации рекомендуется ознакомить Институт молекулярной биологии РАН, Институт молекулярной генетики РАН, Институт биологии гена РАН, Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, Институт цитологии и генетики СО РАН.

К работе нет принципиальных замечаний; отмеченные выше носят технический характер, а поставленные вопросы направлены на выяснение некоторых теоретических понятий или методических деталей.

#### Заключение.

Диссертационная работа Сергея Борисовича Аكوпова «Структурно-функциональный анализ энхансерных и инсуляторных систем регуляции транскрипции» является законченным самостоятельно выполненным научно-исследовательским трудом, содержит новые научно-практические результаты в области молекулярной биологии, совокупность которых можно охарактеризовать как новое крупное достижение в развитии биологической науки. Диссертация полностью соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней ВАК Министерства образования и науки РФ (постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор – С.Б. Аков, заслуживает

присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент

Рысков Алексей Петрович

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

Заведующий лабораторией федерального

государственного бюджетного учреждения науки

Института биологии гена

Российской академии наук

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

Телефон: +7(499) 135-87-41, e-mail: [ryskov@mail.ru](mailto:ryskov@mail.ru)

Подпись А.П. Рыскова заверяю:

Ученый секретарь ИБГ РАН

/ Г.В. Мансурова/

