

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01

на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 24.05.2017 г. № 13

О присуждении **Смирнову Николаю Андреевичу**, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Исследование активности потенциальных инсуляторных и энхансерных элементов генома человека» по специальности 03.01.03 - молекулярная биология, принята к защите 22 марта 2017 г., протокол № 8, диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН) (117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15.02.2013 г.

Соискатель Смирнов Николай Андреевич 1988 года рождения в 2010 году окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» по специальности “биохимия”. В период подготовки диссертации с 2010 по 2013 гг. являлся аспирантом очной формы обучения ИБХ РАН. В настоящее время работает в ЗАО «БИОКАД» менеджером по трансферу аналитических методик.

Диссертация выполнена в лаборатории структуры и функций генов человека ИБХ РАН.

Научный руководитель – Акопов Сергей Борисович, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории структуры и функций генов человека ИБХ РАН.

Официальные оппоненты:

Чуриков Николай Андреевич, д.б.н., профессор, заведующий лабораторией эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии имени В.А.Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН);

Артамонова Ирена Игоревна, к.б.н., старший научный сотрудник отдела вычислительной биологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук (ИОГен РАН)

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), г. Москва, в своем положительном заключении, подписанном д.б.н., проф. О.В. Яровой, главным научным сотрудником лаборатории структурно-функциональной организации хромосом, и утвержденном директором ИБГ РАН академиком РАН П.Г. Георгиевым, указала, что диссертационная работа Смирнова Николая Андреевича «Исследование активности потенциальных инсуляторных и энхансерных элементов генома человека», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 (молекулярная биология), удовлетворяет всем требованиям, предъявляемым "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 24.04.16 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а сам автор, несомненно, достоин присуждения искомой степени.

Соискатель имеет 11 опубликованных работ по теме диссертации, 4 из которых – научные статьи объемом 3,5 печатных листа, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, входящих в международные базы данных Web of Science и Scopus. Наиболее значимые научные работы, в которые соискатель внес основной или существенный вклад:

Дидыч Д.А., Смирнов Н.А., Котова Е.С., Акопов С.Б., Николаев Л.Г., Свердлов Е.Д. «Функциональная диссекция энхансерного элемента, расположенного во втором интроне гена U2AF1L4 человека» Биохимия, 2011. том. 76, вып. 8, стр. 951-957

Смирнов Н.А., Дидыч Д.А., Акопов С.Б., Николаев Л.Г., Свердлов Е.Д. «Оценка энхансер-блокирующей активности инсуляторов при помощи транзientной трансфекции». Биохимия, 2013, том 78, вып. 8, стр. 1141 – 1150

Didych D.A., Shamsutdinov M.F., Smirnov N.A., Akopov S.B., Monastyrskaya G.S., Uspenskaya N.Y., Nikolaev L.G., Sverdlov E.D. «Human PSENE1 and U2AF1L4 genes are concertedly regulated by a genuine bidirectional promoter» Gene 515 (2013) 34–41

Smirnov N.A., Akopov S.B., Didych D.A., Nikolaev L.G. «In trans promoter activation by enhancers in transient transfection» Gene 603 (2017) 15–20

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента д.б.н., профессора Чурикова Николая Андреевича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1.1. На рисунке 4 диссертации, иллюстрирующем физическую карту района 19 хромосомы, не указаны координаты. При этом используется неудачный термин “метрическая карта”, вместо более емкого термина “физическая карта”. Не приведена физическая карта всего изучаемого района хромосомы между генами *FXYD5* и *COX7A1* с указанием расположения детально исследуемых районов. 1.2. Цели исследования изложены то в настоящем, то в прошедшем времени. 1.3. Имеются неудачные и громоздкие фразы, как-то: “...исчерпывающий функциональный анализ регуляторных элементов на уровне отдельных сопряженных сегментов с последующим интегрированием полученных данных...” (стр. 8 диссертации и стр. 3 автореферата).

2. Отзыв официального оппонента к.б.н. Артамоновой Ирины Игоревны. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

2.1. В разделе 4.1.2 текста диссертации проверяется гипотеза о связывании консервативным участком энхансера 12 транскрипционных факторов Sp1 и AP2. Сайт связывания Sp1 указан на рисунке 8, а в тексте отмечается его консервативность. Для AP2, напротив, сайт связывания не приведен на рисунке, а его консервативность не обсуждается. При проверке конкуренции за связывание с белками ядерного экстракта исследовали сайты по отдельности, но, по-видимому, не пробовали тестировать в качестве конкурента комбинацию сайтов, что было бы интересно. 2.2. В разделе 4.2.3 упоминается наличие в изучаемом двунаправленном промоторе CpG-обогащенной области, но наличие островка не показано и никак не проиллюстрировано. 2.3. В качестве потенциальных инсуляторов, в разделе 4.3.2, были тестированы несколько геномных фрагментов, выбранных в результате позитивно-негативной селекции. Было бы полезно кратко описать суть этого метода в работе, а не ограничиваться ссылкой на соответствующую публикацию. 2.4. В разделе 4.4.2, согласно подписи, рисунок

20 иллюстрирует активацию промотора Ptk различными энхансерами, однако в тексте диссертации, со ссылкой на рис. 20, обсуждается совместная трансфекция конструкциями, несущими энхансер и промотор цитомегаловируса. Неясно, какой из промоторов, исследованных в данном разделе, на самом деле активировался энхансером CMV более чем в 10 раз. 2.5. Один из самых красивых, на мой взгляд, экспериментов, поставленных в ходе работы, доказывает пространственное сближение энхансера и промотора при активации в *транс*-положении. Стоило бы показать пространственное сближение не только для сильного и хорошо изученного энхансера CMV, но и для геномных фрагментов, энхансерная активность которых впервые продемонстрирована в данной работе. 2.6. Несмотря на очень понятное и лаконичное, в целом, изложение материала, в тексте довольно много опечаток, грамматических и пунктуационных ошибок, неудачных выражений. Подписи к рисункам также недостаточно аккуратны и, иногда, точны (например, рис. 13, 14, 17, 19 и др.).

3. Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

3.1. Общий краткий стиль изложения обзора литературы. 3.2. Литературный обзор не включает в себя описание двунаправленных промоторов, изучению которых была уделена одна из глав диссертации. 3.3. К недостаткам стоит отнести то, что взаимосвязь промотора и энхансера никак не исследована, несмотря на то что причиной исследования была заявлена пространственная близость указанных элементов. На наш взгляд данный вопрос нуждается в более детальной проработке.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их достижениями в областях (03.01.03 – молекулярная биология) науки, соответствующих тематике диссертации, в частности в области исследований структуры хроматина, ДНК-белковых взаимодействий и ДНК-зависимых процессов, что подтверждается наличием у них большого количества публикаций в высокоцитируемых российских и зарубежных журналах по теме диссертации соискателя. Их высокая квалификация позволяет объективно оценить научное и практическое значение представленной диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований удалось более точно локализовать энхансер 12 и

выявить в нем консервативные области. Удалось доказать, что область, расположенная между сближенными TSS генов *PSENNEN* и *U2AF1L4*, является истинным двунаправленным промотором. При этом было показано, что эти гены координированно экспрессируются в нескольких клеточных линиях. Определены старты транскрипции и консервативные области промотора, а также их функциональная роль в работе промотора. Эти данные важны для понимания механизмов регуляции данных генов. Проведен функциональный анализ энхансерной, сайленсерной и энхансер-блокирующей активности последовательностей, расположенных в локусе *FXYD5-COX7A1* хромосомы 19 человека. Показано, что активация промотора энхансером в *транс*-положении возможна не только для вирусных энхансеров, но и для геномных регуляторных элементов. Активность энхансера в *транс*-положении зависит от промотора и типа клеток и, как было показано с помощью 3С анализа, включает в себя физическую сближенность промотора с энхансером.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что полученные результаты расширяют существующие представления о молекулярных механизмах работы энхансерных и инсуляторных элементов генома человека. Расширены представления об эффекте *транс*-активации, показан механизм данного эффекта.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что изученные регуляторные элементы могут быть использованы для дальнейших исследований в области функциональной геномики в ведущих научных учреждениях РАН - Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Институте молекулярной генетики РАН, Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Институте биологии гена РАН. Стоит отметить, что проверенные энхансер-блокирующие элементы могут быть использованы в составе генотерапевтических ретровирусных конструкций и защиты их от эффекта положения в состоянии, интегрированном в геном.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальные работы были проведены с использованием сертифицированного оборудования и материалов, показана воспроизводимость

результатов исследования. Теоретические предположения и концепции, использованные в работе, построены на основе современных литературных данных по теме диссертации, а полученные автором результаты с ними согласуются. В ходе выполнения работы были использованы современные методики молекулярной биологии.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в выборе направления исследований, разработке и выборе экспериментальных подходов, обработке и анализе полученных экспериментальных данных. Основные экспериментальные данные получены соискателем лично за исключением данных флуоресцентной микроскопии, полученных совместно с сотрудником лаборатории структуры и функций генов человека (ИБХ РАН) Дидычем Дмитрием Александровичем. Подготовка основных публикаций по выполненной работе проведена при непосредственном участии автора.

На заседании 24 мая 2017 года диссертационный совет принял решение присудить Смирнову Николаю Андреевичу ученую степень кандидата биологических наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 23 человек, из них 7 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 03.01.31 - молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 22, против - 0, недействительных бюллетеней - 1.

Председатель
диссертационного совета

академик РАН Иванов В.Т.

Ученый секретарь
диссертационного совета



д.ф.-м.н. Олейников В.А.