

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА О ДИССЕРТАЦИИ

Смирнова Николая Андреевича “Исследование активности потенциальных инсуляторных и энхансерных элементов генома человека”, представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация Смирнова Н.А. посвящена важной проблеме – изучению молекулярных механизмов регуляции экспрессии генов. В последнее два десятилетия эта область исследований развивалась особенно стремительно. Были обнаружены структуры хромосом на разных уровнях их организации и регуляторные элементы разных классов, которые обеспечивают локальную и дистантную регуляцию экспрессии генов. Эти данные позволили сформулировать концепцию эпигенетики, которая связана с разнообразными механизмами наследования паттернов экспрессии генов в ряду клеточных делений в митозе и даже в мейозе и не связана с изменением в нуклеотидной последовательности ДНК. Инсуляторы и энхансеры – занимают важное место в регуляции экспрессии генов и активно изучаются в настоящее время в разных геномах. Диссертационная работа Смирнова Н.А. посвящена актуальной проблеме – изучению инсуляторов и энхансеров в геноме человека.

Общей целью работы был функциональный анализ нескольких цис-регуляторных энхансеров и инсуляторов в примерно 1-Mb области хромосомы 19 человека, расположенной между генами *FXVD5* и *COX7A1*, в которой расположено более 30 генов. Регуляторные элементы в данной области были выбраны на основании ранее полученных данных в лаборатории структуры и функций генов человека ИБХ РАН с использованием оригинального метода позитивно-негативной селекции, а также на основе данных проекта ChIP-seq ENCODE. Были поставлены конкретные цели: провести анализ короткой последовательности ДНК,

расположенной между сближенными TSS генов *PSENNEN* и *U2AF1L4*; выявить консервативные области в энхансере 12, расположенном во втором интроне гена *U2AF1L4*, а также выяснить – возможна ли транс-активация промотора энхансером в системе экспрессии репортерного гена.

Для решения задач исследования автор использовал самые современные методы молекулярной биологии: Методы клонирования и секвенирования ДНК, создание генетических конструкций, содержащих изучаемые регуляторные элементы и репортерные гены, 5'RACE, RT-PCR, EMSA, метод 3С для изучения топологии трансфецированных конструкций, методы сравнительной геномики и сайт-специфического мутагенеза, а также ряд других.

В результате кропотливой и большой работы удалось более точно локализовать энхансер 12 и выявить в нем консервативные области. Обнаружено, что область, расположенная между сближенными TSS генов *PSENNEN* и *U2AF1L4*, является истинным двунаправленным промотором. Найдено, 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.

С помощью созданной генетической конструкции, содержащей энхансеры и репортерный ген, был проведен поиск инсуляторов в области 19 хромосомы, расположенной между генами *FXYD5* и *COX7A1*. Использовали несколько энхансеров и пять потенциальных инсуляторов. В результате экспериментов по трансфекции линейными ДНК конструкций получены количественные данные, согласно которым четыре фрагмента ДНК содержат инсуляторы.

Самая интересная, на мой взгляд, часть работы связана с изучением возможности транс-взаимодействия генетических конструкций. Хорошо

продуманные эксперименты позволили обнаружить, что энхансер может усиливать транскрипцию в транс-положении. Этот интересный факт независимо подтвержден экспериментами ЗС, в которых обнаружено, что промотор и энхансер, находящиеся в разных плаزمиде, пространственно сближены.

Как практически любая работа, данная диссертация не лишена некоторых недостатков. Так, 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. Цели исследования изложены то в настоящем, то в прошедшем времени. 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. Следует отметить, что указанные недостатки не снижают высокого уровня работы и не касаются ее основных результатов и выводов.

Диссертационная работа Смирнова Н.А. изложена на 119 страницах машинописного текста и включает Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и их Обсуждение, а также Заключение и Выводы. Список цитируемой литературы содержит 275 ссылок. Диссертация изложена хорошим литературным языком и хорошо иллюстрирована. Автор владеет большим арсеналом современных методов.

Результаты диссертационной работы могут быть использованы для новых фундаментальных молекулярно-биологических и медико-

биологических исследований, связанных с изучением механизмов регуляции генов, эволюции промоторов и энхансеров в разных геномах, проводимых в Федеральных государственных бюджетных учреждениях науки – в Институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Институте молекулярной генетики РАН, Институте общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Онкоцентре, Институте цитологии и генетики СО РАН, на Биологическом факультете МГУ и в ряде других учреждениях образования и науки РФ.

Автор, используя самые современные подходы и методы молекулярной биологии, получил новые достоверные результаты. Диссертационная работа апробирована на семи российских и международных конференциях, ее материал достаточно полно представлен в четырех статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, входящих в перечень, утвержденный Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций. Теоретический уровень диссертационной работы не оставляет сомнений в том, что она представляет собой законченное, актуальное и достоверное научное исследование. Эта работа, несомненно, представляет собой существенный научный вклад в область знаний, которая непосредственно касается проблемы изучения эпигенетической регуляции экспрессии генов, и, несомненно, соответствует профилю выбранной специальности – “молекулярная биология”.

Содержание диссертации должным образом отражено в автореферате и опубликованных работах. Выводы носят конкретный характер, соответствуют поставленным задачам и адекватно отражают полученные результаты.

Диссертация представляет собой научно-квалификационную работу, имеющую существенное значение для актуального направления

молекулярной биологии – изучения механизмов регуляции экспрессии генов.

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 утвержденными Постановлением Правительства РФ от 24.04.16 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), а её автор, Смирнов Николай Андреевич, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – “молекулярная биология”.

Отзыв на диссертационную работу Смирнова Н.А. обсужден и одобрен на семинаре лаборатории эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов ИМБ РАН 21 апреля 2017 года.

Заведующий лабораторией  
эпигенетических механизмов  
регуляции экспрессии генов ИМБ РАН,  
д.б.н., проф.  
Чуриков Николай Андреевич  
Тел. +7(499)1359702; e-mail: [tchurikov@eimb.ru](mailto:tchurikov@eimb.ru)



Н.А. Чуриков

