

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу

Николая Андреевича Смирнова

«Исследование активности потенциальных инсуляторных и энхансерных элементов генома человека»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация Н.А. Смирнова, является одним из результатов проекта, реализуемого в лаборатории структуры и функций генов человека ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, по изучению *цис*-регуляторных элементов в протяженном хромосомном локусе генома человека длиной 1 млн. п.н.

Работа направлена на решение одной из самых важных задач современной функциональной геномики – идентификацию и функциональный анализ регуляторных элементов в геномах эукариотических организмов. Актуальность и значимость работы для расширения наших представлений о расположении в геноме и функции *цис*-регуляторных элементов, их влиянии на экспрессию окружающих генов в клетках разных органов и тканей, углубленного понимания координированной регуляции экспрессии ансамблей генов и участия в этой регуляции различных функциональных областей генома не вызывает сомнения. Диссертация изложена на 119 страницах машинописного текста и построена по традиционному плану. Работа состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение» и «Заключение и выводы». Список цитируемой литературы включает 275 ссылок, присутствуют работы 2016 года.

В обзоре литературы автор обстоятельно и критически анализирует доступный на сегодняшний день обширный материал, касающийся роли

энхансеров и энхансер-блокирующих элементов в регуляции экспрессии генов. Обзор состоит из двух частей. В первой части обзора литературы автор описывает и систематизирует имеющиеся в литературе данные, касающиеся характерных особенностей инсуляторов - последовательностей ДНК, нарушающих взаимодействие энхансера с промотором или выполняющих барьерную функцию. Н.А. Смирновым рассмотрены особенности функционирования данного класса элементов на примере хорошо изученных инсуляторов, также обобщены данные по локализации инсуляторов относительно регулируемых ими генов, изложены принятые на данный момент функциональные и структурные модели работы инсуляторов.

Автор также подробно проанализировал роль белка CTCF в регуляции транскрипционной активности, в частности, в проявлении энхансер-блокирующей функции инсуляторов. В работе систематизирована информация о распределении сайтов CTCF относительно генов, отмечена важная роль белка CTCF в структурной организации генома совместно с белками когезинового комплекса.

Вторая часть обзора литературы посвящена описанию и обобщению основных свойств энхансерных элементов генома, моделям и механизмам, описывающим функционирование представителей этого класса *cis*-регуляторных последовательностей. В работе рассмотрен вопрос и о механизмах регуляции активности энхансеров, рассмотрены наиболее изученные представители данного класса элементов.

В экспериментально же части, состоящей из четырех разделов, автор, наоборот, сначала подробно исследует функциональные особенности энхансера 12 и расположенного рядом двунаправленного промотора, а затем рассматривает несколько геномных фрагментов в качестве потенциальных инсуляторов.

В первой части главы «Результаты и их обсуждение» автором проведен детальный анализ энхансеро-подобного элемента, обнаруженного ранее во втором интроне гена *U2AF1L4*. Кроме того, с помощью метода сдвига

электрофоретической подвижности показана функциональная консервативность ортологичных последовательностей семи видов приматов.

Во второй части работы автор провел детальный анализ промотора, расположенного в межгенной области генов *PSENFEN* и *U2AF1L4*, в непосредственной близости от описанного ранее энхансера 12. Используя широкий набор молекулярно биологических методов, таких как 5'-RACE, количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, сайт-специфического мутагенеза и метода анализа активности репортерного гена было показано, что данный промотор является двунаправленным.

Третья часть работы посвящена анализу в системе транзientной экспрессии репортерного гена энхансерной и энхансер-блокирующей активности фрагментов ДНК, отобранных с использованием оригинального подхода позитивно-негативной селекции, а также на основании данных ChIP-seq проекта ENCODE. В рамках данной задачи Смирнов Н.А. сконструировал набор базовых векторов, предназначенных для поставленной задачи, доказал функциональность полученной системы, проверив энхансер-блокирующую активность хорошо изученного HS4-инсулятора из бета-глобинового локуса кур. С использованием полученной системы были количественно охарактеризованы девять энхансер-блокирующих и шесть энхансерных элементов.

В заключительной части работы автор исследовал эффект активации промотора энхансером в *транс*-положении в транзientных трансфекциях. В серии изящных экспериментов было показано, что активация промотора энхансером в *транс*-положении возможна не только для вирусных энхансеров, но и для геномных регуляторных элементов. При этом 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.

Оценивая диссертацию в целом, прежде всего, хочется отметить четко

разработанную методологию доказательства энхансерной и инсуляторной активностей геномных фрагментов, а также выделить насыщенный информацией обзор литературы, полно отражающий современное состояние исследований в области изучения регуляции генома человека и предоставляющий всю необходимую вводную информацию по теме диссертации.

Однако я вынуждена высказать и несколько замечаний по обсуждаемой диссертационной работе:

- 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) В разделе 4.2.3 упоминается наличие в изучаемом двунаправленном промоторе CpG-обогащенной области, но наличие островка не показано и никак не проиллюстрировано.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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 не достаточно аккуратны и, иногда, точны (например, рис. 13, 14, 17, 19 и др.).

Высказанные замечания, впрочем, носят рекомендательный характер и ни в коей мере не снижают значимости предпринятых диссертантом усилий и полученных результатов.

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

Автореферат с достаточной полнотой отражает содержание диссертации.

Подводя итог анализу диссертации Н.А. Смирнова, следует заключить, что работа, несомненно, является оригинальным экспериментальным исследованием, выполненным на высоком методическом и теоретическом уровне.

Полученные результаты могут быть использованы в работах российских и зарубежных лабораторий, исследующих механизмы регуляции

