



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ
ОРГАНИЗАЦИЙ**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки**

**Институт молекулярной биологии им. В.А.
Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)**

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@imb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

УТВЕРЖДАЮ

Зам. Директора ИМБ РАН,
д.б.н, проф., чл.-корр. РАН



В.Л. Карпов

«22» ноября 2016 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу

**Котовой Елены Сергеевны «Идентификация и анализ активности
СТСФ-зависимых регуляторных элементов», представленной на
соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.01.03 – молекулярная биология**

Диссертация Котовой Е.С. посвящена важной проблеме - изучению механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов. В последнее десятилетие эта область исследований развивалась особенно стремительно. Были обнаружены различные механизмы, определяющие паттерны экспрессии генов в развитии и в ряду клеточных делений. Важную роль в

формировании и в последующем наследовании паттернов экспрессии генов играют метилирование ДНК, некодирующие РНК разных классов, модификации гистонов, а также механизмы, в которых принимают участие энхансеры, инсуляторы и сложные белковые комплексы, взаимодействующие с ними.

Диссертационная работа посвящена актуальной проблеме - изучению одного из важных участников эпигенетической регуляции экспрессии генов эукариот – белку CTCF. Он является многофункциональным белком, который, связываясь с ДНК, принимает участие в механизмах активации и репрессии транскрипции, в формировании архитектуры хроматина, выполняет функции инсулятора и некоторые другие. В качестве модели автор выбрал хромосомный домен, содержащий α -глобиновый локус кур, который нередко используется для изучения организации хроматина. Целью работы было выявление в нем CTCF-связывающих участков, сравнение мест связывания CTCF в клетках эритроидного и лимфоидного происхождения.

Для выявления мест связывания CTCF автор сначала провел работу по выделению самого белка с помощью экспрессии клонированного куриного CTCF, содержащего шесть гистидинов на N-конце. Полученный препарат охарактеризован с помощью Вестерн-блот анализа. В дополнительных экспериментах было продемонстрировано, что присутствие искусственно введенных гистидинов не препятствовало связыванию белка с контрольными последовательностями. Кроме того, диссертант выяснил, что экспрессированный таким образом CTCF транспортируется в ядро, т.е. имеет неповрежденный сигнал ядерной локализации. В ходе дальнейшей работы были улучшены условия очистки экспрессированного белка и проведен его функциональный анализ *in vitro* с помощью торможения меченой ДНК, специфически связывающейся с белком, в геле.

Эти предварительные этапы работы позволили приступить к выявлению мест связывания CTCF в α -глобиновом локусе. Для этого 230-kb

область из ВАС-клона была амплифицирована в виде перекрывающихся коротких рестриктных фрагментов ДНК. Библиотека меченных фрагментов ДНК использовалась для связывания с белком. Анализ такой смеси проводили с помощью двухмерного электрофореза, последовательно в нативных условиях и в присутствии SDS. Это позволило выделить фрагменты ДНК локуса, которые связывались с CTCF. Они были клонированы и секвенированы. Так были картированы места связывания CTCF в исходной 230-kb последовательности ДНК.

В дополнительных экспериментах была оценена специфичность связывания картированных фрагментов с помощью прежнего метода торможения ДНК в геле, а также с помощью дополнительного торможения (super shift), наблюдаемого после связывания антител с комплексом ДНК-CTCF. Поскольку эти методы используют связывание белка с ДНК *in vitro*, в качестве независимого подхода диссертант использовал хроматин-иммунопреципитацию и ПЦР в реальном времени. Так было подтверждено, что обогащение фрагментами ДНК, которое наблюдали используя торможения в геле, не является результатом неспецифической сорбции.

Окончательно вопрос о местах связывания CTCF был решён с помощью метода ChIP-Seq в масштабах генома. Были выявлены также и консенсусные последовательности мест связывания, а также обнаружено, что при индукции дифференцировки число мест связывания CTCF в геноме уменьшается. Кроме того, получены данные о местах связывания CTCF и в изучаемом локусе. Используя геномный браузер, удалось обнаружить связывание белка CTCF в области сайленсера-энхансера α -глобинового локуса в клетках линии HD3 и эмбриональных эритроблестах кур.

Как любая работа, данная диссертация не лишена некоторых недостатков. Прежде всего, это касается расположения рисунков в диссертации. Обычно они расположены на удалении 2-6 стр. от места описания рисунка в тексте, что создает неудобство при прочтении. На наш взгляд заголовки мог быть более конкретным, с указанием генома и локуса.

Диссертационная работа Котовой Е.С. изложена на 118 страницах машинописного текста и включает Введение, Основную часть, включающую в себя Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение; а также Заключение и выводы. Список цитируемой литературы содержит 202 ссылки. 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 доменной структуры хромосом и механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов, 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 трех 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 механизмов 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.

Диссертационная работа Котовой Елены Сергеевны «Идентификация и анализ активности СТСФ-зависимых регуляторных элементов», 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.

Отзыв на диссертационную работу Котовой Е.С. обсужден и одобрен на семинаре лаборатории эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов ИМБ РАН 18 ноября 2016 года.

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



Н.А. Чуриков