

## **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 14.12.2016 г. № 14

о присуждении **Котовой Елене Сергеевне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация “Идентификация и анализ активности СТСФ-зависимых регуляторных элементов” по специальности 03.01.03 - молекулярная биология, принята к защите 12.10.2016 г., протокол № 12, 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 Котова Елена Сергеевна 1986 года рождения в 2008 году окончила Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, по специальности “биохимия”. В период подготовки диссертации с 2008 по 2011 гг. являлась аспирантом очной формы обучения ИБХ РАН. В настоящее время работает научным сотрудником в Федеральном государственном бюджетном учреждении “Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства”.

Диссертация выполнена в лаборатории структуры и функций генов ИБХ РАН.

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

Официальные оппоненты:

**Пасюкова Елена Генриховна**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией геномной изменчивости Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук;

**Величко Артем Константинович**, кандидат биологических наук, старший

научный сотрудник лаборатории структурно-функциональной организации хромосом Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН), г. Москва, в своем положительном заключении, подписанном д.б.н., проф. Н.А. Чуриковым, заведующим лабораторией эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов, и утвержденном зам. директора ИМБ РАН чл.-корр. РАН В.Л. Карповым, указала, что диссертационная работа Котовой Елены Сергеевны «Идентификация и анализ активности CTCF-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.

Соискатель имеет 10 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 7 работ, 4 из которых – статьи объемом 5,38 печ.л., опубликованные в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы данных Web of Science и/или Scopus. Наиболее значимые научные работы, в которые соискатель внес основной или существенный вклад:

1. Котова Е.С., Сорокина И.В., Акопов С.Б., Николаев Л.Г., Свердлов Е.Д. (2013) Экспрессия гена CTCF кур в клетках COS-1 и частичная очистка белка CTCF. Биохимия. 78(8): 879-883.

2. Gushchanskaya E.S., Artemov A.V., Ulyanov S.V., Logacheva M.D., Penin A.A., Kotova E.S., Akopov S.B., Nikolaev L.G., Iarovaia O.V., Sverdlov E.D, Gavrilov A.A., Razin S.V. (2014) The clustering of CpG islands may constitute an important determinant of the 3D organization of interphase chromosomes. Epigenetics. 9(7):951-963.

3. Kotova E.S., Akopov S.B., Sverdlov E.D., Nikolaev L.G. (2014) Transcription factor CTCF and mammalian genome organization. Biopolymers and Cell. 30(4): 260–272.

4. Котова Е.С., Акопов С.Б., Дидыч Д.А., Петрова Н.В., Яровая О.В., Разин С.В., Николаев Л.Г. (2016) Связывание белкового фактора CTCF в  $\alpha$ -глобиновом локусе генома кур. Acta Naturae. 8(1):99–106.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Отзыв официального оппонента д.б.н., профессора Пасюковой Елены Генриховны. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: 1.1. Хотелось бы более четко понимать, каково соответствие между четырьмя блоками, из которых состоит сайт, выявленными в ряде исследований, и коровой и тремя прилегающими областями, описанными позднее; возможно, стоило бы отметить это на рисунке 1. 1.2. На рисунке 2 изображен белок, опосредующий взаимодействие двух белков CTCF; стоило бы увязать с рисунком текст главки, посвященной взаимодействию CTCF с белками (1.2.4). 1.3. На стр. 64 сказано: «очистка в две стадии позволила нам получить фракцию, содержащую около 10% полноразмерного белка CTCF». Стоило бы более подробно объяснить, откуда взят этот процент. 1.4. Хотелось бы увидеть в тексте краткое объяснение, почему для получения фрагментов ДНК использовали мелкощепящие рестриктазы и, главное, почему две. 1.5. На рис. 11 представлена зависимость количества выявленных уникальных областей от количества полученных сиквенсов. Как строился этот график, с каких сиквенсов начинали и какими заканчивали? 1.6. На стр.72, сравнивая свои результаты с опубликованными, соискатель пишет: «По результатам секвенирования библиотеки, полученной в результате двумерного EMSA, один сайт связывания CTCF (10d1) располагается в высоко представленном в библиотеке рестриктном фрагменте ДНК (11 сиквенсов), два сайта связывания CTCF (10d2 и 5d1) – в средне представленной последовательности (3 сиквенса) и один (10d3)– в слабо представленной (1 сиквенс)». Было бы желательно увидеть эти совпавшие сайты на обобщающем рис. 12, однако на нем представлен другой набор опубликованных сайтов. 1.7. На стр. 81 написано: «При сравнении занятости белком CTCF этого сайта с применением t-теста Стьюдента в случае клеток HD3 и DT40  $p < 0.05$ ». Следовало бы, описывая статистический анализ, указать вместо занятости белком конкретный использованный мерный признак. 1.8. На рисунке 16А нет дорожки, соответствующей клеткам DT40, хотя в подписи к рисунку она указана. 1.9. На рис. 16Б и рис. 19Б следовало подписать оси ординат. 1.10. Форма вывода 1 кажется мне неоптимальной. Все же вывод должен содержать информацию не о том, что было сделано, а о том, каков научный итог этого сделанного. 1.11. Также у оппонента возникли нарекания к использованию и расшифровке сокращений, отмечено большое количество опечаток.

2. Отзыв официального оппонента к.б.н. Величко Артема Константиновича.

Отзыв положительный, содержит следующие замечания: 2.1. Введение очень отягощено избыточной информацией. 2.2. Слишком мало внимания уделено структурным и функциональным особенностям  $\alpha$ -глобинового локуса кур, который и являлся основной моделью исследования. 2.3. Не ясно назначение раздела «стандартные методики». Все, что описано в нем, более подробно в том или ином виде описывается в последующих разделах. 2.4. Очередность некоторых разделов не вполне логична, к примеру, раздел «культивирование клеток» встречается в тексте намного позже, чем описание трансфекции культуры клеток и получения клеточных экстрактов. 2.5. На стр. 59 автор пишет: «Был проведен Вестерн-блот анализ клеточных лизатов, с антителами к белку CTCF и антителами к гистидиновому тагу». Однако на рисунке 5 представлен вестерн-блот только для белков CTCF и GAPDH. 2.6. Автор использует для доказательства правильной функциональной активности рекомбинантного CTCF метод EMSA. Однако все же это *in vitro* модель. Более надежной проверкой способности рекомбинантного белка привлекаться к CTCF-связывающим сайтам была бы хроматин иммунопреципитация за антитела против гистидинового тага из клеток, с заведомо картированными сайтами посадки CTCF, например, в HeLa. 2.7. На стр.76 автор пишет: «Смещение и исчезновение полос, соответствующих ДНК-белковым комплексам, после добавления антител к CTCF и к гистидиновому тагу свидетельствует о том, что именно CTCF, присутствующий в ядерном экстракте взаимодействует с каждым из фрагментов ДНК». Было бы неплохо добавить к этому эксперименту контроль на неспецифическое связывание антител, т.е. инкубировать ДНК-белковые комплексы с какими-нибудь неспецифичными антителами, например, против белка тауматина, которые автор использовал в качестве контроля на неспецифическое связывание в экспериментах по иммунопреципитации хроматина. 2.8. Есть ряд незначительных замечаний оформительского характера. 2.9. Отмечено наличие неудачных выражений.

3. Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания: 3.1. 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. 3.2. На наш взгляд заголовок мог быть более конкретным, с указанием генома и локуса.

4. Отзыв на автореферат к.б.н. Воробьевой Ольги Владимировны, старшего научного сотрудника кафедры гидробиологии Биологического факультета ФГБОУ ВО Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Отзыв положительный. Содержит замечание о наличии в автореферате опечаток.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их достижениями в областях 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 описанная в работе методика получения белковой фракции, обогащенной куриным CTCF с N-концевым гистидиновым тагом, специфично взаимодействующим с CTCF-связывающими фрагментами ДНК, была предложена впервые. Впервые были выявлены 79 областей  $\alpha$ -глобинового локуса кур, способных связывать CTCF *in vitro*. Впервые были картированы тысячи областей генома кур, связывающих белок CTCF *in vivo* в клетках линии HD3, интактных и индуцированных к дифференцировке, линии DT40. Было продемонстрировано связывание CTCF с тремя участками локуса  $\alpha$ -глобиновых генов, как в эритроидных, так и в лимфоидных неэмбриональных куриных клетках. Был продемонстрирован тканеспецифичный характер связывания белка CTCF с одним из выявленных CTCF-связывающих участков альфа-глобинового локуса.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что диссертация Котовой Е.С. имеет фундаментальную направленность и расширяет существующие представления о расположении сайтов связывания CTCF в  $\alpha$ -глобиновом локусе кур и возможной роли, которую играет этот белок в регуляции экспрессии генов локуса. При этом применительно к проблематике диссертации результативно использован комплекс существующих экспериментальных методик, таких как двумерный EMSA, ChIP-seq и др.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что они могут быть использованы в дальнейшем для изучения

механизмов регуляции экспрессии генов на уровне хроматиновых доменов как в  $\alpha$ -глобиновом локусе кур, так и в других областях геномов позвоночных. Известно, что изменения в экспрессии и связывании CTCF с ДНК наблюдаются при различных заболеваниях. На основе полученных данных могут быть выявлены закономерности, важные для развития медицины и ветеринарии.

Оценка достоверности результатов исследования основывается на том, что они получены с использованием сертифицированного оборудования и материалов, показана воспроизводимость результатов исследования, они согласуются с имеющимися литературными данными по теме диссертации.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном получении соискателем основных экспериментальных данных, описанных в диссертационной работе, их анализе и интерпретации, выполненных лично автором. Основные экспериментальные манипуляции, осуществлялись лично соискателем. Подготовка публикаций происходила совместно с другими авторами данных работ при непосредственном участии соискателя.

На заседании 14 декабря 2016 г. диссертационный совет принял решение присудить Котовой Елене Сергеевне ученую степень кандидата биологических наук. При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человек, из них 7 докторов наук (по специальности 03.01.03 – молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Заместитель председателя  
диссертационного совета  
член-корр. РАН

В.М. Липкин

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
д.ф.-м.н.



В.А. Олейников