

## ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе **Елены Сергеевны Котовой** на тему «Идентификация и анализ активности CTCF-зависимых регуляторных элементов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

### Актуальность исследования

Дифференциальная экспрессия генов лежит в основе развития организма и специфической работы различных тканей и органов на протяжении жизни. Различные механизмы регуляции экспрессии генов привлекают в последнее время все большее внимание исследователей. Такой интерес объясняется потребностью понять, каким образом регулируется нормальное развитие и функционирование организма, чем обусловлена его реакция на изменяющиеся условия среды обитания, позволяющая сохранять гомеостаз, и каковы причины возникновения отклонений и патологий в процессе реализации генетической информации. В связи с этим фундаментальные научные исследования, проводимые в этой области, крайне востребованы и актуальны. Они совершенно необходимы для выработки стратегии и конкретных методов корректировки экспрессии генома при появлении различных нарушений согласованной работы генов, приводящих к возникновению патологий.

Регуляция экспрессии генов – чрезвычайно сложный, разнонаправленный и многоуровневый процесс. Именно поэтому, несмотря на многочисленные исследования и существенный прогресс в области изучения различных регуляторных механизмов, очень многое остается неясным. Доскональное описание и анализ различных систем регуляции, участвующих в реализации генетической информации, лежит на пути к пониманию принципов работы живого организма. Диссертационная работа Е. С. Котовой вносит достойный вклад в развитие этой актуальной области науки.

### Научная новизна исследования

Несмотря на огромные возможности, открывшиеся перед биологами благодаря возможности получать информацию о целых геномах различных видов и отдельных особей, роль многих последовательностей генома, главным образом, некодирующих, пока неизвестна. Для того чтобы понять ее, нужны экспериментальные исследования с использованием адекватных моделей. Работа Е. С. Котовой посвящена исследованию регуляторных элементов, которые определяют связывание с ДНК ряда регуляторных белков, прежде всего, белка CTCF, участвующего в регуляции транскрипции и формировании функциональных компартов хроматина. С одной стороны, эта система регуляции достаточно хорошо изучена, с другой стороны, она представляется настолько сложной, что закономерности и механизмы регуляции еще очень далеки от ясности. Собственно, взаимодействие белка CTCF с CTCF-зависимыми регуляторными элементами представляет собой яркий пример того, насколько неоднозначными, разнонаправленными могут быть результаты этого взаимодействия с точки зрения регуляции активности генов. Е. С. Котова сделала успешную попытку разобраться в некоторых аспектах работы этой сложной и потому особо интересной регуляторной системы. Оригинальность и новизна данной диссертационной работы обусловлены тем, что автор использовал как исчерпывающий полногеномный скрининг сайтов связывания регуляторного белка CTCF, так и удачную функциональную модель взаимодействия белка CTCF с CTCF-зависимыми регуляторными элементами на примере конкретного локуса – кластера альфа-

глобиновых генов кур. В области альфа-глобиновых генов Е. С. Котовой удалось выявить как сайты связывания CTCF, общие для клеток, имеющих разную функцию, так и сайты, специфичные для определенного типа клеток и стадии развития. Полученные результаты открывают возможность дальнейшего плодотворного исследования этой сложной регуляторной системы.

### **Структура и содержание работы, достоверность и обоснованность научных результатов**

Диссертация построена по стандартному плану. Во «Введении» вкратце описано современное состояние исследований в той области науки, в которой работает автор; обозначен вопрос, заслуживающий дальнейшего изучения и, соответственно, поставлены цели и задачи конкретного исследования, представленного в диссертационной работе. «Обзор литературы» представляет собой не очень большой по объему, но насыщенный информацией раздел диссертационной работы, состоящий из трех глав, посвященных описанию свойств белка CTCF и его роли в регуляции функционального статуса участков ДНК и отдельных генов. Соискатель убедительно продемонстрировал широту своих знаний, касающихся исследуемой системы регуляции. Глава в целом написана ясно и легко читается, однако есть и отдельные неясности. Упомяну описание сайта связывания CTCF. 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. 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). Некоторые нарекания вызывает использование и расшифровка сокращений. Надо сразу отметить, что в конце работы приведен подробный список сокращений (не всех: что такое н.о. в подписи к рис. 1, 14 и на стр.67?), тем не менее, и в тексте стоило бы использовать их более последовательно и аккуратно. Например, на стр. 6 упомянута «область MRE» без расшифровки и в то же время на стр. 7 дважды расшифровано сокращение EMSA. И такое встречается систематически. Еще примеры: на стр. 18 метод Hi-C не расшифрован, TAD расшифрован, на стр. 21 технология 3C расшифрована, ChIA-PET не расшифрован. В одном случае такой способ изложения мешает восприятию текста, особенно потому, что это самое его начало: это касается задач работы № 4 и № 5, в одной из которых упомянут метод «иммунопреципитации хроматина», без указания конкретной модификации, а в другой – «метод ChIP-seq».

Для проведения исследования соискателем был использован набор разнообразных современных методов. Методический уровень диссертации, безусловно, заслуживает высокой оценки. Раздел «Материалы и методы» написан подробно, с указанием всех необходимых деталей использованных методов. Принципиальное описание методов содержится и в главе «Результаты», что облегчает восприятие материала. Следует отметить, что практически все основные использованные в работе методы (EMSA, а особенно EMSA с дополнительным торможением и двумерный EMSA, а также все модификации хроматиновой иммунопреципитации) являются чрезвычайно сложными как для правильной постановки, так и для адекватной интерпретации, особенно при сравнении результатов, полученных разными способами и на разном материале. Несомненная заслуга Е. С. Котовой заключается в том, что все полученные данные были скрупулезно разобраны и очень аккуратно, даже осторожно интерпретированы. Соискатель продемонстрировал хорошую квалификацию и

профессиональную зрелость, выдвинув возможные, основанные на опубликованных результатах других авторов, объяснения отдельных противоречий и избежав неоправданных данными заключений. У меня не возникло принципиальных замечаний по существу работы. Отдельные недостатки, обнаруженные в изложении результатов, отмечены ниже.

На стр. 64 сказано: «очистка в две стадии позволила нам получить фракцию, содержащую около 10% полноразмерного белка СТСФ». Стоило бы более подробно объяснить, откуда взят этот процент, сославшись не просто на рисунок 7Б, а указав дорожки Ni и Ni/10. Ведь именно белок из этой фракции послужил основой получения множества других данных.

Хотелось бы увидеть в тексте краткое объяснение, почему для получения фрагментов ДНК использовали мелкощепящие рестриктазы и, главное, почему две. Для квалификационной работы это было бы уместно, особенно учитывая, что многие другие методические подходы подробно объясняются в работе. Ведь в процессе анализа результатов объединение фрагментов двух типов вносит определенный «шум» в итак очень непростые данные.

На рис. 11 представлена зависимость количества выявленных уникальных областей от количества полученных сиквенсов. Как строился этот график, с каких сиквенсов начинали и какими заканчивали?

На стр.72, сравнивая свои результаты с опубликованными, соискатель пишет: «По результатам секвенирования библиотеки, полученной в результате двумерного EMSA, один сайт связывания СТСФ (10d1) располагается в высоко представленном в библиотеке рестриктном фрагменте ДНК (11 сиквенсов), два сайта связывания СТСФ (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. Это путает и затрудняет восприятие материала.

На стр. 81 написано: «При сравнении занятости белком СТСФ 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.

На рисунке 16А нет дорожки, соответствующей клеткам DT40, хотя в подписи к рисунку она указана.

На рис. 16Б и рис. 19Б следовало подписать оси ординат.

В тексте работы довольно много опечаток. Для оценки работы это неважно, хотя было бы лучше, если бы их не было. Но встречаются огрехи, которые мешают пониманию написанного. Вот яркий пример (стр. 80): «Методом ПЦР в реальном времени был проведен анализ обогащения иммунопреципитов хроматина СТСФ-связывающих фрагментов, выявленными в результате двумерного EMSA» Если бы не контекст, понять смысл этой фразы было бы невозможно.

Диссертационная работа завершается разделом «Заключение», содержащим собственно заключение, а также выводы. У меня нет замечаний по существу сделанных выводов, однако 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.

## Заключение о научно-практической ценности работы и соответствии её требованиям ВАК

Диссертационная работа Е.С. Котовой является законченным, актуальным, оригинальным, выполненным на высоком научном и методическом уровне исследованием. Работа имеет большую научную ценность: базируясь на комбинации изощренных современных методов, она проливает новый свет на особенности работы сложной и важной системы регуляции активности генов высших организмов. Результаты работы могут быть использованы в образовательных курсах по молекулярной биологии и молекулярной генетике, а также в научно-исследовательской работе Институты и Университетов биологического, медицинского и сельскохозяйственного профиля. Работа имеет также отдаленную практическую перспективу. Молекулярный инструментарий, позволяющий изменять экспрессию генов, потенциально можно рассматривать в контексте использования для практических целей медицины и сельского хозяйства. Высказанные в отзыве критические замечания не снижают качество работы в целом.

Выводы работы адекватны полученным результатам, опубликованным в рейтинговых международных журналах и научных журналах, входящих в перечень, утвержденный Минобрнауки России для опубликования основных научных результатов диссертаций, а также представленным на различных научных конференциях. Содержание Автореферата в полной мере отражает содержание диссертации. Тематика диссертации полностью соответствует специальности 03.01.03 – молекулярная биология. В целом работа удовлетворяет требованиям "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 24.04.2016 г. № 335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. № 748), предъявляемым к кандидатской диссертации, а ее автор, Елена Сергеевна Котова, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

Официальный оппонент:

Заведующий лабораторией геномной изменчивости  
ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН (ИМГ РАН)  
доктор биологических наук,  
профессор

Пасюкова Елена Генриховна

Адрес: Москва, пл. Академика И. В. Курчатова, д. 2;  
Тел.: +7-499-1961909;  
E-mail: [egpas@img.ras.ru](mailto:egpas@img.ras.ru)

Подпись Е. Г. Пасюковой заверяю.

Ученый секретарь ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН,  
кандидат биологических наук  
Андреева Людмила Евгеньевна

