

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Котовой Елены Сергеевны «Идентификация и анализ активности CTCF-зависимых регуляторных элементов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

На сегодняшний день изучение механизмов регуляции экспрессии генов является важным и интереснейшим направлением фундаментальной науки. Регуляция работы генов, их активация и репрессия определяются не просто фактом наличия для них определённых регуляторных элементов (промоторов, энхансеров, сайленсеров и т.д.), но и их специфичными пространственными взаимодействиями, организованными в пределах так называемых функциональных хроматиновых доменов. Доменная гипотеза организации генома высших эукариот предполагает, что геном состоит из единообразных структурных единиц, функционирующих сходным образом. Однако существует множество «неканонических» доменов, одной из характеристик которых является их расположение в богатых генами областях, где тканеспецифичные гены соседствуют с неродственными генами «домашнего хозяйства», и в которых, таким образом, должны совмещаться принципиально разные транскрипционные и репликативные программы. Одним из кандидатов, обеспечивающих функциональную изоляцию перекрывающихся регуляторных систем является транскрипционный фактор CTCF. Кроме того, CTCF считается одним из базовых организаторов трехмерной структуры генома. Таким образом идентификация и функциональный анализ сайтов связывания CTCF в геноме является принципиальной задачей для понимания механизмов, регулирующих процессы транскрипции и репликации, а также общие принципы организации эукариотического генома. Диссертация Котовой Е.С. как раз и находится в русле этого важного направления и посвящена идентификации участков

ДНК, связывающих CTCF *in vitro* и *in vivo* в геноме эритроидных и лимфоидных клеток кур.

Диссертационная работа Котовой Е.С. изложена в традиционной форме, содержит основные разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение и выводы. Изложена на 118 страницах, содержит 19 рисунков и 6 таблиц. Список цитируемой литературы включает 202 источника.

В разделе «Введение» очень подробно обоснованы актуальность и выбор темы диссертации, представлена научная значимость работы, сформулированы цели и задачи. Однако на мой взгляд введение очень отягощено избыточной информацией. К примеру, описанием транскрипционной активности альфа-глобинового локуса и методических подходов к изучению сайтов связывания CTCF. Все эти моменты стоило бы вынести в обзор литературы.

Обзор литературы состоит из разделов, посвященных описанию функциональных свойств CTCF и его роли в регуляции ДНК-ассоциированных процессов. В целом обзор литературы написан хорошим научным языком, и даёт представление об области исследования. Однако слишком мало внимания уделено структурным и функциональным особенностям альфа-глобинового локуса кур, который и являлся основной моделью исследования. Конечно, этот вопрос частично рассматривается во введении, однако там это делается практически без ссылок на литературу. В обзоре литературы хотелось бы видеть разделы, посвященные общей характеристике доменов открытого типа, к которым относятся альфа-глобиновый локус, структурно-функциональной организации альфа-глобинового домена, а также CTCF-зависимых регуляторных элементов характерных для него.

Глава «Материалы и методы» включает описание реактивов, оборудования и методических подходов, использованных автором в диссертационной работе. Методы описаны достаточно подробно, чтобы их

можно было воспроизвести. Следует отметить, что работа выполнена на высоком современном уровне с использованием большого арсенала современных методов молекулярной и клеточной биологии, таких как: молекулярное клонирование, выделение и очистка рекомбинантного белка, иммунопреципитация хроматина, EMSA и 2D-EMSA. Кроме того, стоит отметить использование автором некоторых биоинформатических подходов для анализа результатов ChIP-seq. Тем не менее к главе «материалы и методы» имеются некоторые замечания. Во-первых, не ясно назначение раздела «стандартные методики». Все что описано в нем, более подробно в том или ином виде описывается в последующих разделах. Во-вторых, 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.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из двух разделов. Первая часть посвящена выделению и очистке рекомбинантного CTCF и анализу его способности специфично связываться с известными CTCF-связывающими последовательностями. После доказательства правильной функциональной активности рекомбинантного CTCF, автор с помощью метода двумерного сдвига электрофоретической подвижности (2D-EMSA) получил библиотеки CTCF-связывающих последовательностей для альфа-глобинового локуса кур. В результате анализа данных, полученных после секвенирования библиотеки было выявлено значительное количество уникальных последовательностей, связывающих CTCF в *in vitro* системе. Затем с помощью иммунопреципитации хроматина автор демонстрирует, что из тринадцати выявленных 2D-EMSA участков ДНК, расположенных по близости от генов α -глобинов, только один связывает CTCF *in vivo*. Стоит отметить высокий уровень доказательности экспериментов этого раздела, и наличие большинства необходимых контролей.

Во второй части с помощью метода ChIP-seq был проведен полногеномный поиск областей, связывающих CTCF *in vivo*, в клетках линии

HD3, HD3 после индукции эритроидной дифференцировки, и в клетках лимфоидной линии DT40. Очень интересным и важным результатом этой части работы, является падение ассоциации CTCF с хроматином при индукции эритроидной дифференцировки. Автор демонстрирует, что в индуцированных к эритроидной дифференцировке клетках HD3 средняя занятость белком CTCF его сайтов связывания примерно в 1,5 раза ниже, чем в интактных, что может свидетельствовать не только о структурной реорганизации альфа-глобинового локуса, но и о масштабной пространственной реорганизации всего генома в условиях дифференцировки.

К разделу «результаты и обсуждение» также есть некоторые вопросы. 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. В разделе «Анализ способности белка CTCF с N-концевым гистидиновым тагом взаимодействовать с CTCF-связывающими последовательностями» 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. 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.

К диссертации также есть ряд незначительных замечаний оформительского характера. На мой взгляд текст выглядел бы более эстетично, если бы был центрирован не по левому, а по обоим краям. Текст подписей к рисункам необходимо по возможности уместать на одной странице. На рисунках 9, 10 диссертации отсутствует указание молекулярных масс маркера на агарозных электрофореграммах. Кроме того, в диссертации встречаются неудачные выражения: «колоколизация генов» - стр. 3 автореферата, «меченые фрагменты ДНК находятся на ПААГ» - стр. 56, «добавляли 120 мкл агарозы... в течение 1 часа» - стр. 51, а также неуместные англицизмы - «режим 30 сетов» - стр. 50.

Все высказанные замечания и пожелания, однако, не носят принципиального характера и не снижают ценности работы. Работа носит полноценный и завершённый характер. Эксперименты, проделанные Котовой Е.С. грамотно спланированы, и их результаты корректно интерпретированы. Не вызывает сомнения также новизна работы и её научная значимость. Цели диссертационной работы достигнуты, сделанные выводы полностью обоснованы и соответствуют целям и задачам исследования. Результаты работы опубликованы в 4 статьях в рецензируемых российских и международных журналах, что также подтверждает актуальность и новизну исследования. Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы, включая постановку задач и основные результаты. Таким образом представленная диссертационная работа Котовой Елены Сергеевны «Идентификация и анализ активности STCF-зависимых регуляторных элементов» полностью соответствует требованиям «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. №842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. №748,

предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
лаборатории структурно-функциональной
организации хромосом Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Института биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)

Величко Артем Константинович

119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

E-mail: velichkoak@gmail.com

тел. +7(962)9600745

Подпись Величко А.К. заверяю

Ученый секретарь ИБГ РАН, к.б.н.



Мансурова Г.В.