

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Голова Аркадия Константиновича «Солевая чувствительность связывания экструзионных комплексов когезина с хроматином», представленную в диссертационный совет 24.1.035.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии гена Российской академии наук на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. «Молекулярная биология»

Актуальность темы

Диссертационное исследование Аркадия Константиновича Голова посвящено изучению связывания экструзионных комплексов когезина с хроматином. В настоящее время активно обсуждается участие комплекса когезин, как в когезии сестринских хроматид после репликации, так и в экстрезии структурных петель хроматина, а также взаимосвязь этих процессов. Разграничение этих двух функций для одного и того же белкового SMC-комплекса с тем, чтобы описать оба эти механизма, - непростая, но крайне востребованная задача, с которой автор успешно справился. Актуальность исследования также определяется тем, что мутации в генах, кодирующих входящие в состав когезина субъединицы, могут вызывать нарушения развития, так называемые «когезинопатии».

В последнее время также активно развиваются методы анализа трехмерной архитектуры хроматина, позволяющие определить появление топологически ассоциированных доменов, структурных и транскрипционных петель хроматина на разных стадиях клеточного цикла. Применение таких подходов в настоящее время играет ключевую роль в установлении механизмов локальной укладки хроматина, в том числе экстрезии ДНК-петель. В связи с этим, разработка нового оптимизированного подхода на основе метода фиксации конформации хромосом для анализа локальной укладки хроматина представляется очень своевременной.

Новизна и научная значимость

Полученные А.К. Головым результаты обладают высокой научной новизной, вносят существенный вклад в развитие фундаментальных представлений об организации хроматина и имеют практическую и теоретическую значимость. На основе протокола фиксации конформации хромосом (3C) автором был разработан новый метод для детального изучения трехмерной структуры хроматина. Разработанный протокол S-TALE позволяет анализировать локальную укладку хроматина в районах интереса длиной около 1 млн.п.о. с разрешением, сопоставимым или превосходящим таковое для метода Hi-C.

В работе было впервые показано, что CTCF-ассоциированные структурные хроматиновые петли, сформированные в результате экструзии в клетках человека, удерживаются когезиновыми комплексами, взаимодействующими с основаниями этих петель нетопологически, не заключая ни одну из двух взаимодействующих ДНК-нитей внутрь белкового кольца.

Кроме того, диссертантом впервые предложен гипотетический механизм, согласно которому терминация экструзии сопряжена с PDS5A/B-WAPL-зависимым топологическим надеванием когезиновых колец на ДНК-нить.

Структура и содержание диссертации

Диссертационная работа Аркадия Константиновича Голова изложена на 158 страницах и имеет следующую структуру: введение, список используемых сокращений, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы, список литературы и приложение. Работа содержит 27 рисунков и 2 таблицы; список цитируемой литературы включает 258 источников.

Во введении описана актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. Перечислены положения, выносимые на защиту, степень достоверности и апробация результатов, личный вклад соискателя, публикации по теме работы. Цель исследования состояла в изучении модальности связывания когезинового комплекса с ДНК-нитью в процессе экструзии, а также взаимосвязи между процессами экструзии и когезии хроматина.

Обзор литературы состоит из пяти разделов, включая «Структура когезина и принципы взаимодействия когезинового комплекса с ДНК», «Роль когезина в клеточной физиологии», «Цикл конформационных изменений когезинового комплекса при экструзии ДНК-петель». Обзор литературы основан на анализе оригинальных экспериментальных публикаций, критического их осмысления и обобщения. Большое внимание уделяется роли когезина в когезии сестринских хроматид и экструзии ДНК-петель, а также взаимосвязи между этими клеточными процессами. Эта глава снабжена одной таблицей и 16 оригинальными рисунками и представляет собой самостоятельный труд по современным представлениям о строении и конформационных изменениях комплекса когезин, механизмах взаимодействия когезинового кольца с ДНК и роли комплекса когезин в экструзии петель хроматина, заслуживающий отдельной публикации.

Раздел «Материалы и методы» включает подробное и достаточное для воспроизведения описание методик, используемых в работе, начиная с базовых молекулярно-биологических методов, таких как выделение ДНК ВАС-клонов, получение библиотек ДНК-зондов, культивирование и синхронизация клеток, иммуноблоттинг, и заканчивая подробным изложением предложенного автором нового метода C-TALE и анализом данных секвенирования C-TALE и ChIP-seq библиотек. Этот раздел также сопровождается схемами экспериментов.

Результаты объединены с их обсуждением; материал изложен логично и ясно. Раздел «Результаты и обсуждение» можно разделить на две основные части. Первая часть посвящена разработке нового метода анализа локальной укладки хроматина C-TALE. Протокол сопровождается подробным описанием и схемой всех этапов, включая этап обогащения полногеномной библиотеки продуктов лигирования фрагментами из района интереса, а также этап анализа данных, полученных с помощью C-TALE. Уникальная особенность предложенного диссертантом протокола – использование вставок одного или нескольких ВАС-клонов, покрывающих район интереса, для получения модифицированных гаптенами зондов, используемых для обогащения библиотек. Таким образом, к преимуществам разработанного метода можно отнести легкодоступность библиотек ВАС-клонов и его невысокую стоимость. Диссертант оценивает не только преимущества, но и недостатки предложенного подхода, что свидетельствует о всестороннем анализе эффективности метода C-TALE по сравнению с другими сходными протоколами. Так, приведено сравнение метода C-TALE с шестью другими протоколами целевого обогащения 3C-seq/Hi-C библиотек по такому показателю как доля химерных пар, картирующихся в район интереса, среди всех прочтений. Успешная апробация разработанного диссертантом протокола на геномах разных модельных организмов – человека, крысы, курицы и *Danio rerio*, безусловно, усиливает работу.

Вторая часть раздела «Результаты и Обсуждение» посвящена модальности связывания когезинового комплекса с ДНК-нитью в процессе экструзии. А.К. Головым проведена проверка трех гипотетических сценариев, описывающих модальность связывания когезина с основаниями растущей петли при экструзии: псевдотопологическая экструзия, нетопологическая экструзия и топологическая экструзия. Контактные карты C-TALE экспериментов на хроматине клеток HeLa в G1-фазе клеточного цикла после инкубации в изотоническом буфере сравнивали с таковыми после инкубации в высокосолевым буфере; все эксперименты

сопровождаются отдельными биологическими повторностями. Кроме того, сохранение или потерю связывания комплекса когезин с хроматином анализировали с помощью методов иммуноблоттинга и ChIP-seq, что повышает достоверность полученных результатов. Автором установлена чувствительность CTCF-ассоциированных когезиновых колец к солевой экстракции в клетках млекопитающих. Хотелось бы отметить грамотную постановку эксперимента с использованием позитивного и негативного контролей: связывание с хроматином компонентов комплекса когезин SMC3 и RAD21 сравнивали со связыванием транскрипционного фактора CTCF, который должен полностью экстрагироваться из ядер высокосолевыми буферами, и со связыванием гистона H2B, который должен сохранять связь с ДНК при выбранных экспериментальных условиях. Предложены модели связывания когезиновых комплексов с основаниями петель, объясняющие наблюдаемую солевую чувствительность этих структур. Полученные в ходе выполнения диссертационного исследования результаты, а также данные литературы, свидетельствуют о том, что наилучшей моделью для описания этого явления оказывается именно нетопологическая экструзия.

Чтобы объяснить механистическую связь между экструзией петель хроматина и топологическим надеванием когезинового комплекса на нить ДНК диссертант также предложил модифицированную модель регуляции цикла экструзии, в которой терминация экструзии сопряжена с PDS5A/B-WAPL-зависимым топологическим надеванием колец когезина на ДНК. Таким образом, имеется перспектива для дальнейшей экспериментальной проверки этой модели с целью раскрытия механизмов, обеспечивающих экструзию петель хроматина.

Полученные результаты суммированы в виде 4 выводов, в которых концентрированно изложены основные положения. Выводы обоснованы и подтверждаются полученными экспериментальными данными. Автореферат диссертации дает полное представление об основных положениях работы.

Замечания и вопросы

Во время прочтения работы появилось несколько замечаний и вопросов:

1. Автор отмечает, что «на экструзионной активности когезина основаны важнейшие наднуклеосомные паттерны укладки ДНК: структурные петли». Какова по данным литературы роль конденсина в этих процессах?

2. По мнению автора, могут ли карты контактов хроматина, полученные в результате C-TALE экспериментов, изменяться после инкубации в высокосолевого буфере не из-за удаления компонентов комплекса когезин, а из-за нарушения связывания с хроматином каких-либо других комплексов, например, комплекса конденсин?

3. В разделе «Материалы» не указан источник клеточной линии HeLa, из какого банка клеточных культур она была получена?

4. На рисунке 26 не отмечена панель Б «Парные коэффициенты корреляции...».

Изложенные выше вопросы и замечания не влияют на достоверность, научную новизну и высокую научную значимость полученных Аркадием Константиновичем Головым результатов и сформулированных выводов. Личный вклад автора в получение изложенных в диссертации результатов не вызывает сомнений и отражен в опубликованных по материалам исследования публикациях, в том числе в трех экспериментальных статьях в международных рецензируемых журналах «Epigenetics and Chromatin» (импакт-фактор 5.488) и «Methods» (импакт-фактор 4.647).

Заключение

Диссертационная работа Голова Аркадия Константиновича «Солевая чувствительность связывания экструзионных комплексов когезина с

хроматином», представленная к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. «Молекулярная биология», полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук и установленным «Положением о порядке присуждения ученых степеней», утвержденным Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Алла Валерьевна Красикова,
кандидат биологических наук по
специальности 03.00.25 – Гистология,
цитология, клеточная биология,
доцент кафедры цитологии и
гистологии Санкт-Петербургского
государственного университета



Дата: 26.10.2023

Контактная информация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» Россия, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9. Тел. +7 (812) 328-20-00, e-mail: spbu@spbu.ru. Сайт: spbu.ru. Кафедра цитологии и гистологии СПбГУ, Тел. + 7 (812) 328-96-87, e-mail: a.krasikova@spbu.ru



Личную подпись

Завещаю

Красиковой А. В.

26.10.2023