

## **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 экструсионной 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 высокосолевым 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 экструсионных 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  
Красиковой А.В.  
ЗАВЕРЯЮ

26.10.2023