

**ОТЗЫВ официального оппонента**  
**на диссертацию на соискание ученой степени**  
**кандидата биологических наук Сивкиной Анастасии Львовны на тему**  
**«Роль субъединиц и доменов комплекса FACT в разворачивании нуклеосом»**  
**по специальности 1.5.3 (03.01.03) – молекулярная биология**

Представленная на рассмотрение диссертационного совета работа Сивкиной А.Л. посвящена изучению механизмов работы комплекс FACT – шаперона гистонов, который играет в клетках эукариот множество функций, связанных с ремоделированием нуклеосом и хроматина в процессах репликации и репарации ДНК, транскрипции, клеточной дифференцировки и канцерогенеза. Несмотря на то, что FACT является одним из классических объектов исследований в области структуры хроматина и регуляции экспрессии генов эукариот, молекулярные механизмы его действия постепенно становятся понятны только в последние годы, что связано с бурным развитием современных методов структурной и молекулярной биологии и биофизики. Стоит отметить, что высокая актуальность данной работы связана с тем, что комплекс FACT является не только одним из основных шаперонов, обеспечивающих функционирование генома, но и важной мишенью для антираковой терапии. Рассматриваемая работа вносит важный вклад в эти исследования, так как на примере FACT с помощью нескольких экспериментальных подходов позволяет лучше понять основные принципы работы хроматиновых шаперонов. Результаты работы важны как для проведения дальнейших фундаментальных исследований, так и для поиска новых классов медицинских препаратов, действующих на структуру хроматина.

Диссертационная работа изложена на 125 страницах и включает в себя следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение и выводы, Приложения, Список сокращений и список литературы, содержащий 160 ссылок. Краткая характеристика отдельных разделов работы приведена ниже.

Обзор литературы посвящен описанию механизмов действия белков, действующих на структуру нуклеосом и хроматина. В основном рассмотрены АТФ-независимые факторы, связывающиеся с ДНК и гистонами и способные

изменять структуру хроматина. Значительная часть обзора посвящена фактору Nhr6 дрожжей из группы HMGB-белков, который способен взаимодействовать с ДНК за счет своего положительного заряда и регулирует работу многих комплексов, действующих на хроматин, включая FACT. Кроме того, в обзоре рассмотрены современные данные о структуре и функциях самого комплекса FACT, исследованию которого и посвящена эта работа. Стоит отметить, что часть обзора уже опубликована автором диссертации. Обзор написан достаточно четким и ясным языком и полностью выполняет свою функцию знакомства читателей с темой исследования.

В разделе Материалы и Методы детально описаны использованные материалы, оборудование, а также основные методы исследований. Следует отметить, что в работе применен достаточно широкий спектр методов, включающий сборку и очистку нуклеосом (а также тетрасом и хроматосом), анализ комплексов нуклеосом с фактором FACT и его мутантными формами методами электрофореза в нативных и денатурирующих условиях, проведение экспериментов по FRET-микроскопии единичных частиц (single particle FRET) и электронной микроскопии исследуемых комплексов. Описание большинства методов достаточно подробно и полностью соответствует содержанию экспериментальной работы.

Раздел Результаты и обсуждение состоит из пяти глав, посвященных анализу структуры комплексов FACT дрожжей и человека в отсутствие и в присутствии белка Nhr6, изучению процесса разворачивания нуклеосом комплексом FACT дрожжей, изучению действия дрожжевого FACT на тетрасомы и хроматосомы, исследованию роли С-концевых доменов дрожжевого FACT в разворачивании нуклеосом, а также исследованию процесса разворачивания нуклеосом человеческим комплексом FACT в присутствии кураксинов. Стоит отметить, что в работе для анализа структуры ДНК-белковых использовано несколько взаимодополняющих подходов: метод замедления в геле и FRET в геле, метод spFRET, методы электронной микроскопии, что позволило исследовать структурные перестройки комплексов альтернативными способами и получить достаточно достоверную картину изменений комплексов FACT с нуклеосомой в процессе их ремоделирования.

Результаты работы представляют несомненный интерес для широкого круга ученых, работающих в области исследований структуры хроматина, механизмов регуляции экспрессии генов эукариот, структуры и функций хроматин-ремоделирующих факторов. Среди полученных результатов в качестве наиболее интересных я хотел бы отметить следующие:

- 1) Показано, что для полноценного разворачивания нуклеосом как дрожжевому, так и человеческому комплексу FACT необходимы дополнительные факторы: HMGB-белок Nhr6 в случае дрожжей, кураксины (или какие-то дополнительные факторы, присутствующие в клетках) в случае FACT человека. Вероятно, комплекс FACT способен «улавливать» и стабилизировать частично развернутые конформации нуклеосомы, образующиеся в результате действия других факторов, что может быть важно для его функций в процессах репликации, транскрипции, репарации ДНК.
- 2) На основе полученных результатов в работе предложены вполне правдоподобные модели взаимодействий FACT с нуклеосомой, которые могут служить основой для проведения дальнейших структурных и биохимических экспериментов, направленных на их проверку, а также для поиска новых модуляторов и ингибиторов активности FACT.

С учетом несомненной научной и практической значимости работы, не возникает сомнений в том, что ее автор достоин присуждения искомой ученой степени. В то же время, диссертация не лишена недостатков, связанных с описанием и интерпретацией некоторых экспериментов, а также с представлением результатов и оформлением работы. Имеющиеся замечания кратко описаны ниже.

- 1) Первая половина обзора литературы, посвященная структуре нуклеосомы, комплексам ремоделирования хроматина и белку Nhr6, в основном описывает довольно старые работы, в нем практически отсутствуют ссылки на современные исследования. Часть данных явно устарела (например, существование 30 нм фибриллы надежно опровергнуто, но она все еще нарисована на рис. 1, хотя и со знаком вопроса). Полностью отсутствуют данные о механизмах работы АТФ-зависимых комплексов ремоделирования хроматина,

они только упоминаются в тексте. Между тем, именно для этих комплексов в последние годы получены многочисленные структурные данные и предложены детальные механизмы изменения структуры нуклеосом. Обсуждение этих данных было бы очень полезно для сравнения с работой фактора FACT. При описании данных про FACT иногда представлены ссылки на обзоры вместо оригинальных экспериментальных статей (например, когда речь идет о роли FACT в разрешении R-петель и др.). На с. 30, когда речь идет о ДНК-полимеразе альфа, сказано, что она синтезирует отстающую цепь ДНК, хотя известно, что она совместно с праймазой ответственна за синтез праймеров (а цитируемая работа относится к 1997 г., когда другие полимеразы еще не были открыты). В обзор литературы также стоило бы добавить данные о современных структурных исследованиях FACT, в том числе, с использованием метода криоэлектронной микроскопии, которые вместо этого частично приведены в разделе Результаты (с. 89, рис. 28).

2) Материалы и методы в целом описаны достаточно подробно, но некоторые детали экспериментов требуют уточнения. Например, важно знать, как именно выделяли гистоны и нуклеосомы (даны просто ссылки на ранние работы), делали ли это непосредственно в данной работе или использовали готовые препараты? Кстати, при описании сборки тетрасом в Результаты ошибочно написано, что добавляли октамер гистонов (с. 80). В нескольких местах указано напряжение при проведении электрофореза, но не указан размер геля, сказано о центрифугировании «на максимальных оборотах», используется слово «глицерол» вместо глицерина.

3) В начале результатов стоило бы добавить небольшое введение с описанием плана работы в соответствии с поставленными задачами.

4) При описании экспериментов в Результаты стоило бы объяснить, почему в различных случаях использовали нуклеосомы из разных источников и почему флуоресцентные метки помещали в разные положения нуклеосомной ДНК (далеко не всегда это очевидно).

5) При описании данных электронной микроскопии для каждого из комплексов представлен набор структур, репрезентативность которых сложно оценить без детального анализа всех полученных классов частиц. Статистика для этих классов не приводится. Количественные данные в большинстве случаев

отсутствуют, только в некоторых экспериментах приведены цифры по относительному количеству «закрытой» или «открытой» конформации комплексов. В результате читателю приходится верить автору «на слово», когда речь идет о том, что в присутствии FАСТ и дополнительных факторов происходит большее или меньшее разворачивание нуклеосомы, структура более или менее асимметрична и т.д. Например, на рис. 23 представлен набор классов для FАСТ с делецией С-концевого домена Rob3 и сказано, что частично развернутые классы в этом случае менее разнообразны, а структура более асимметрична, но на самом рисунке показано одинаковое число изображений и насколько они репрезентативны, неизвестно. Последовательность «превращений» этих комплексов тоже является предположительной. Еще сложнее проверить правильность интерпретации этих структур, когда в электронные плотности «вписываются» определенные домены FАСТ и нуклеосом, а какие-то домены оказываются невидимыми. Понятно, что это обычные проблемы при применении данного метода с таким разрешением, а значительная часть экспериментов по электронной микроскопии оставлена за рамками текста диссертации, так как эти эксперименты были выполнены совместно с другими исследователями. Тем не менее в работе стоило бы постараться представить более четкую количественную и качественную характеристику анализируемых классов частиц.

6) В отличие от экспериментов по электронной микроскопии, данные по spFRET везде представлены в явном виде, с количественной обработкой результатов, что делает возможной их четкую интерпретацию в рамках диссертации. Единственно, что стоило бы добавить в описание результатов – это указать число проанализированных частиц для каждого эксперимента spFRET.

7) Много вопросов вызывает раздел про взаимодействия FАСТ с тетрасомами (с. 80-82). В первом же абзаце сказано, что тетрасомы конформационно подвижны, но данные не приводятся. По крайней мере, стоило бы указать, кем они получены (если автором работы, то включить в диссертацию или не упоминать). Далее на основании гель-электрофореза (рис. 25) сделаны выводы о том, что по отдельности FАСТ и Nhrb на структуру тетрасом не действуют, а вместе действуют. Без дополнительных объяснений непонятно, на основании чего сделаны такие выводы. На рисунке 25 с изображением геля не

подписаны образующиеся комплексы; непонятно, если какие-то изменения в их цвете (эффективность FRET); отсутствует проба, где добавлялся бы только FACT. Аналогичные выводы делаются на основании геля в приложении Д, и этот гель также вызывает много вопросов. Комплексы на рисунке не подписаны, полосы деформированы (похоже, что из-за солевого фронта в геле), так что нельзя исключить, что изменения подвижности комплексов в этом конкретном эксперименте можно было бы не заметить. В связи с этим, стоит с осторожностью делать вывод о том, что FACT не вызывает никаких изменений тетрасомв отсутствие Nhr6 (с. 81).

8) Не вполне понятно, почему на основании экспериментов по сдвигу электрофоретической подвижности комплексов (рис. 13А) был сделан вывод, что с уFACT связывается именно не менее трех молекул Nhr6 (с. 57). Также вызывает вопросы оценка количества связанного Nhr6 на основе анализа состав комплексов с помощью двухстадийного электрофореза (рис. 13Б). В этом опыте показано, что свободный Nhr6 присутствует в достаточно большом количестве в контрольной пробе в той же зоне геля, использованной для анализа (последняя дорожка, Nhr6\*), это количество «на глаз» примерно соответствует его количеству в пробах с делецией одного из С-концевых доменов FACT и лишь ненамного меньше, чем в пробах с полноразмерным FACT (особенно учитывая очень слабую интенсивность окрашивания во всех пробах). Сколько повторностей этого эксперимента выполнено, как проводили количественный анализ данных? Как выглядят остальные части геля (на рисунке показан только его небольшой фрагмент)? Кроме того, на с. 59 при описании этого эксперимента вместо концентраций факторов ошибочно указаны их количества (2-4 мкмоля и т.д.).

9) Некоторые рисунки оставлены без достаточного обсуждения. Например, это относится к рис. 10В в обзоре, в котором представлена модель разворачивания нуклеосомы FACT. Похожая модель обсуждается в рамках полученных в работе результатов – стоило бы прямо объяснить, что в ней нового по сравнению с опубликованными данными. То же самое можно сказать про некоторые рисунки из раздела результаты, и особенно про приложения. Большинство рисунков из приложений содержат существенные результаты и могли бы быть включены в основной текст. Но даже в приложениях они

заслуживают более подробных подписей и описания. Например, на рис. А стоило бы указать позиции всех использованных меток (не только 35/112), на рис. Д нужно отметить все образующиеся комплексы (особенно с учетом того, что на основании этого опыта делаются важные выводы, см. выше), на рис. Д, Ж, З, И нужны данные о концентрациях нуклеосом и факторов (кстати, рис. Ж и З не переведены на русский язык), рис. Л только мельком упоминается в тексте (на с. 98). На некоторые рисунки даны ошибочные ссылки в тексте: например, на рис. 29А нет данных об обратимости разворачивания нуклеосомы (ссылка внизу с. 90), в Приложении Б нет данных о распределении закрытых и открытых классов (ссылка сверху на с. 93) и др.

10) В тексте диссертации присутствует довольно много опечаток и грамматических ошибок. Встречаются также неудачные слова и выражения («вортексируя», «заматывали фильмом» и др.).

Вместе с тем, высказанные замечания не ставят под сомнение высокий научный уровень и значимость диссертационного исследования. Результаты диссертационной работы опубликованы в 8 статьях в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, и представлены на многочисленных российских и международных научных мероприятиях. Автореферат диссертации адекватно отражает содержание и выводы работы.

В целом, диссертация полностью отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к диссертациям на соискание степени кандидата наук. В работе получены новые данные о механизмах функционирования шаперона гистонов FACT дрожжей и человека и его взаимодействиях с нуклеосомами, предложена молекулярная модель функционирования комплекса FACT. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.3 (03.01.03) – молекулярная биология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, и оформлена согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Сивкина Анастасия Львовна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 (03.01.03) – молекулярная биология.

Официальный оппонент:

чл.-корр. РАН, доктор биологических наук,

Заведующий лабораторией молекулярной генетики микроорганизмов

НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ

Кульбачинский Андрей Владимирович

«25» ноября 2022 г.

Контактные данные:

тел.: 7(499)1960015, e-mail: avkulb@yandex.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация:

03.00.03 - молекулярная биология

Адрес места работы:

123182, г. Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2.

Федеральное государственное бюджетное учреждение

Институт молекулярной генетики

Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Телефон: (499) 1960015

Email: img@img.ras.ru

Подпись сотрудника НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ

Кульбачинского А.В. удостоверяю:

Ученый секретарь НИЦ «Курчатовский институт» - ИМГ

кандидат биологических наук

Андреева Людмила Евгеньевна



«25» ноября 2022 г.