

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Фишмана Вениамина Семёновича на тему «Сравнение пространственной организации геномов фибробластов и сперматозоидов мыши методом Hi-C», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Актуальность исследования. Познание принципов организации и функционирования наследственного материала в клетках организмов остается одной из центральных задач современной генетики. Прогресс в данном направлении, наблюдаемый в последние годы, безусловно, связан с развитием высокопроизводительных технологий секвенирования геномов. Однако, расшифровка нуклеотидной последовательности, сама по себе, не обеспечивает возможности установления особенностей пространственной организации генома, а также определения принципов его компактизации, в значительной степени детерминированной молекулярными взаимодействиями с белками хроматина, а не первичной последовательностью ДНК. Следует признать, что до настоящего времени сохраняется заметный недостаток знаний о промежуточных уровнях компактизации генома. Только в последние годы стали появляться исследования, выполненные пока на ограниченном количестве типов клеток, обозначившие топологические пространственные домены в геноме, ассоциированные с разными формами активного и неактивного хроматина. Кроме того, общепризнанное положение о дифференциальной экспрессии генов в разных клетках и тканях организма только в последние годы стало получать поддержку с позиций архитектуры генома, благодаря открытиям не только структурных, но и функциональных репликативных и транскрипционных доменов. Однако, до сих пор остается неясным, в какой степени выявляемые особенности являются универсальными для различных типов клеток и различных этапов онтогенеза.

В этой связи, еще одним проблемным вопросом является преемственность пространственной организации геномов соматических и половых клеток. Какие молекулярные механизмы обеспечивают точную передачу наследственной информации, определенным образом организованной в трехмерном пространстве

клеточного ядра, в онтогенезе и в ряду поколений? Какие процессы задействованы в реорганизации генома половых клеток, объединившихся в зиготе, при запуске программы индивидуального развития, с одной стороны, и с обособлением и дифференцировкой клеток половой линии, с другой стороны? Какую роль в этих процессах играют эпигенетические механизмы, связанные с ковалентными модификациями гистонов и самой ДНК, а также с активностью некодирующих РНК? На изучение этих вопросов и направленно диссертационное исследование Фишмана Вениамина Семёновича «Сравнение пространственной организации геномов фибробластов и сперматозоидов мыши методом Hi-C», актуальность которого не вызывает сомнений.

Следует также отметить, что возможность реализации такого исследования в значительной степени предопределена появлением широкого спектра молекулярно-биологических методов, позволяющих изучать конформационные взаимодействия хроматина с высоким разрешением на уровне целого генома. Однако, интерпретация массивов данных, генерируемых подобными экспериментами, сама по себе является неординарной задачей, требующей применения разнообразных биоинформационных алгоритмов и построения оригинальных интерпретирующих моделей. Это в дополнительной степени подчеркивает новизну и научно-практическую значимость проведенного диссертационного исследования.

Структура диссертационной работы. Диссертация оформлена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», выводов, списка литературы. Диссертация изложена на 113 страницах, содержит 14 рисунков, 3 таблицы и 3 приложения. Список цитируемой литературы включает 113 источников, все из которых, за исключением одного, являются зарубежными, включая собственные публикации автора. Ссылки приведены по состоянию на 2015 год.

Во **Введении** обосновывается актуальность исследования, формулируется цель и задачи диссертационной работы, указывается ее научная новизна, а также теоретическая и практическая значимость полученных результатов. Цен-

тральной идеей работы явился сравнительный анализ особенностей пространственной организации геномов дифференцированной соматической и половой клеток. Реализация этой идеи потребовала проведения исследований, сфокусированных на построении карт пространственных контактов геномной ДНК эмбриональных фибробластов и сперматозоидов мыши, сравнении организации пространственных доменов и частоты контактов индивидуальных локусов в геномах изученных клеток, оценке зависимости частоты контактов участков генома от их линейного расположения в молекуле ДНК, анализе внутри- и межхромосомных взаимодействий. По итогам проведенных исследований автором сформулировано 3 положения, выносимых на защиту, обоснованность и достоверность которых подтверждается существенным объемом полученных и проанализированных экспериментальных данных.

Глава «**Обзор литературы**» содержит исчерпывающий анализ источников литературы, касающихся вопросов топологии и пространственной организации геномов млекопитающих. Изложены современные представления об организации наследственного материала на хромосомном и субхромосомном уровне. Отмечена значимость трехмерной организации генома в регуляции генной экспрессии.

Значительное внимание в обзоре литературы отведено также рассмотрению основных современных методов изучения пространственной организации генома. Последовательно и подробно изложен алгоритм проведения такого анализа, с обсуждением его преимуществ и ограничений. Приведена информация о существующих технологиях моделирования пространственной организации ДНК в ядрах клеток. Обзор завершается рассмотрением сложившихся на сегодняшний день представлений об организации геномов сперматозоидов млекопитающих.

Следует отметить, что обзор литературы хорошо структурирован, логичен и последователен. Его предваряет собственное введение, обозначающее состав и последовательность обсуждаемых вопросов, что обеспечивает при прочтении эффективное формирование целостной картины представлений о существую-

щих взглядах на пространственную организацию генома, методах ее анализа, имеющихся проблемных и нерешенных вопросов.

Глава «**Материалы и методы**» содержит информацию о материале и использованных молекулярно-биологических, биоинформационных и статистических методах. Следует отметить, что проведение полно-геномных исследований на современном уровне требует кооперации нескольких творческих коллективов и материально-технических ресурсов. В связи с этим, неудивительно, что часть работ, включающих получение Hi-C библиотек и их секвенирование, была проведена автором в ходе совместных исследований. Однако информация об использованных в данном разделе работы молекулярно-биологических методах представлена крайне ограниченно – в виде ссылки на опубликованный протокол (Kalhor et al., 2012). Основное же содержание раздела «Методы» посвящено подробному описанию алгоритмов анализа секвенирования Hi-C библиотек, биоинформационной и статистической обработке результатов экспериментов. Следует отметить, что отличительной особенностью данного раздела является подробное представление в нем авторских оригинальных биоинформационных методов, что в плане организации структуры и оформления диссертационной работы выглядит вполне логично, несмотря на то, что в разделе «Методы» фактически представлены собственные результаты исследований.

При описании материала для исследования обращает на себя внимание то, что Hi-C библиотеки для проведения секвенирования были получены из эмбриональных фибробластов мыши. Были ли синхронизированы клеточные культуры перед получением библиотек и если да, то на каких стадиях клеточного цикла было выполнено исследование?

Глава «**Результаты**», безусловно, представляет собой центральный раздел диссертационного исследования. Формально он состоит из трех основных блоков, посвященных, во-первых, анализу результатов полно-геномного секвенирования Hi-C библиотек, фильтрации данных и построению первичных матриц контактов на уровне целого генома; во-вторых, описанию топологических и функциональных доменов в геномах эмбриональных фибробластов и спермато-

зоидов; и, наконец, в-третьих, сравнению особенностей пространственной организации геномов дифференцированных соматических и половых клеток.

Ключевые, принципиальные итоги диссертационного исследования могут быть суммированы следующим образом.

Впервые получены данные об особенностях пространственной организации генома половой клетки млекопитающих. При этом показано, что геном сперматозоида, по сравнению с геномами дифференцированных соматических клеток (исследованными в настоящей работе и представленными в литературе), характеризуется увеличением частот внутриврохромосомных контактов и межхромосомных взаимодействий. Можно согласиться с мнением автора исследования о том, что рост числа внутри- и межхромосомных контактов есть результат суперкомпактизации генома сперматозоидов, обеспечивающей стабильность передачи наследственной информации следующему поколению. В этой связи, возникает вопрос дискуссионного плана. Из цитогенетики развития млекопитающих, и в частности человека, хорошо известен факт преобладания мейотических мутаций материнского, но не отцовского происхождения в возникновении анеуплоидии в эмбриональных клетках. Наряду с известными цитологическими факторами, влияющими на дифференциальную частоту ошибок сегрегации хромосом в женском и мужском мейозе (например, такими как пролонгированная остановка мейоза в оогенезе на стадии диплотены и завершение его только после оплодотворения), оказывает ли дополнительное влияние степень компактизации генома половых клеток, в частности сперматозоидов, на точность хромосомной сегрегации в мейозе?

Второй принципиальный момент связан с тем, что, несмотря на существенные различия в морфологических и функциональных характеристиках эмбриональных фибробластов и сперматозоидов, на кратные отличия в уровне их ploидности, принципы трехмерной организации геномов этих клеток оказываются в значительной степени сходными. Это сходство установлено по таким параметрам, как степенная зависимость распределения частот контактов локусов от расстояния между ними в линейной молекуле ДНК и наличие топологи-

ческих доменов, маркирующих функционально активные и неактивные области хроматина. Этот вывод, представляется важным и новаторским также с нескольких позиций. Во-первых, он демонстрирует существование, по всей видимости, универсальных принципов пространственной компактизации геномов клеток различных типов, в том числе герминативной и соматической линии, что, в свою очередь, указывает на преемственность передачи наследственной информации в ряду поколений, в том числе и на уровне трехмерной организации геномов. Во-вторых, наблюдаемые сходства в организации геномов соматических и половых клеток могут быть дополнительным «молекулярным субстратом», объясняющим феноменологию трансгенерационного эпигенетического наследования, по крайней мере, по мужской линии.

Привлекает внимание еще одно наблюдение, связанное с увеличением числа межхромосомных взаимодействий, коррелирующих с размером хромосомы. Иными словами в результате исследования показано, что крупные хромосомы в кариотипе (1-5, X) в среднем имеют больше контактов между собой, чем это имеет место для хромосом небольшого размера (10-19) в кариотипе мыши. В этой связи возникает вопрос, в какой степени наблюдаемые тенденции дополняют карты хромосомных территорий в пространстве интерфазного ядра?

Наконец, особый интерес представляет выявление 7 участков на хромосомах 5, 12, 13 и 19, пространственная организация которых различается в геномах сперматозоидов и фибробластов. Принимая во внимание их относительно небольшую протяженность, порядка 1 м.п.н. с учетом разрешающих возможностей метода, известен ли генный состав этих регионов? В чем именно выражаются отличия в характере контактов в этих регионах хромосом между исследованными типами клеток – в увеличении или уменьшении частоты контактов, в формировании топологических доменов, характерных для транскрипционно активного и неактивного хроматина? Ответы на эти вопросы представляются особенно актуальными в свете накапливающихся данных о присутствии в зиготе небольшого числа транскриптов отцовского происхождения, необходимых, по

всей видимости, для запуска начальных этапов развития и активации эмбрионального генома (Carbone, Chavez, *Syst Biol Reprod Med.* 2015).

Подводя итог анализу диссертационного исследования, необходимо подчеркнуть его несомненную **новизну и научно-практическую значимость**. В работе впервые с использованием высокоразрешающих полно-геномных технологий анализа конформационных структур хроматина построены пространственные карты геномов фибробласта и сперматозоида. Впервые исследована пространственная организация генома транскрипционно неактивных клеток и гаплоидного генома половых клеток. Разработаны оригинальные биоинформационные методы анализа и моделирования пространственной организации генома. Полученные данные дополняют и поддерживают активно формирующиеся представления о трехмерной организации геномов, а также открывают новые перспективы в изучении роли такого уровня компактизации наследственной информации в ее реализации в ходе онтогенеза и передачи в ряду поколений.

Заключение.

В связи с вышеизложенным можно заключить, что диссертация Фишмана Вениамина Семёновича на тему «Сравнение пространственной организации геномов фибробластов и сперматозоидов мыши методом Hi-C», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является целостной, законченной, самостоятельно выполненной на высоком методическом уровне научно-квалификационной работой. Диссертация содержит новые научные данные, вносящие существенный вклад в понимание особенностей пространственной организации геномов соматических и половых клеток, а полученные автором результаты имеют важное фундаментальное и практическое значение, предоставляя современную методологическую основу для молекулярно-генетического и биоинформационного анализа принципов иерархической организации геномов млекопитающих. Выводы и положения, выносимые на защиту, обоснованы и базируются на существенном объеме результатов проведенного экспериментального исследования. Результаты работы опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК РФ, в том числе в одном из ведущих

мировых журналов (Genome Biology, IF = 10,8) в области молекулярно-биологических основ организации геномов.

Диссертационная работа полностью соответствует критериям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней (постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор Фишман Вениамин Семёнович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

30.09.2015

Заместитель директора по научной работе
Руководитель лаборатории цитогенетики
Федерального государственного бюджетного
научного учреждения «Научно-исследовательский
институт медицинской генетики»,
доктор биологических наук



И.Н. Лебедев

И.Н. Лебедев

Сведения о составителе отзыва:

Лебедев Игорь Николаевич,
доктор биологических наук,
заместитель директора по научной работе,
руководитель лаборатории цитогенетики
Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт медицинской генетики» (ФГБНУ «НИИМГ»)
Адрес: 634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, д. 10
Рабочий телефон: 8(3822) 51-31-46
Факс: 8(3822) 51-37-44
e-mail: igor.lebedev@medgenetics.ru