

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.239.01,
СОЗДАННОГО НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И
ГЕНЕТИКИ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ
НАУК», ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ
КАНДИДАТА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 26 октября 2022 г. № 28

О присуждении Лукьянчиковой Варваре Алексеевне

(гражданка РФ)

ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация Лукьянчиковой В.А. «Особенности трехмерной организации хроматина у представителей комаров рода *Anopheles*» по специальности 1.5.22. – клеточная биология, принята к защите 29.06.2022 г, протокол №12, Диссертационным советом 24.1.239.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», (ИЦиГ СО РАН) (630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 10). Диссертационный совет 24.1.239.01 (Д 003.011.01) утвержден ВАК 15.01.2010, приказ ВАК № 1-7 и переутвержден Министерством образования и науки РФ 11.04.2012 года, приказ № 105/нк.

Соискатель: Лукьянчикова Варвара Алексеевна, 28 июня 1991 года рождения, в 2014 году окончила Факультет естественных наук Новосибирского государственного университета с присуждением степени специалиста по направлению подготовки «биология». В 2019 году окончила

очную аспирантуру НГУ по направлению подготовки «06.06.01 Биологические науки». В настоящее время работает младшим научным сотрудником в секторе постгеномной нейробиологии ИЦиГ СО РАН.

Диссертационная работа выполнена в лаборатории генетики развития ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения российской академии наук», г. Новосибирск.

Научный руководитель – кандидат биологических наук, Фишман Вениамин Семенович, заведующий сектором геномных механизмов онтогенеза, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Официальные оппоненты:

1. **Романенко Светлана Анатольевна**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории цитогенетики животных, ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.
2. **Храмеева Екатерина Евгеньевна**, кандидат биологических наук, старший преподаватель, руководитель лаборатории Центра естественных наук, Автономная некоммерческая организация высшего образования Сколковский институт науки и технологий, г. Москва.

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии гена Российской академии наук», г. Москва, в своём положительном отзыве, подписанном кандидатом биологических наук, старшим научным сотрудником Сергеем Владимировичем Ульяновым, и утвержденном директором ФГБУН Институт биологии гена РАН Георгиевым П.Г., указала, что «Диссертационная работа Лукьянчиковой В.А. «Особенности трехмерной

организации хроматина у представителей комаров рода *Anopheles*» по научной новизне, актуальности, теоретической значимости и другим параметрам соответствует требованиям п.п. 9-14 "Положения о порядке присуждения ученых степеней", утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям, выдвигаемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а её автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.22. – клеточная биология. Отзыв заслушан и одобрен на межлабораторном семинаре Отдела клеточной геномики ФГБУН Институт биологии гена РАН 13 октября 2022 г.»

Соискатель имеет всего 19 опубликованных работ, из них по теме диссертации 8, общим объемом 52 страницы, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях (Wos, Scopus) и 4 тезиса в материалах всероссийских и международных конференций. Во всех опубликованных работах личный вклад автора был определяющий. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах.

Наиболее значительные публикации по теме диссертации:

1. **Lukyanchikova V**, Nuriddinov M, Belokopytova P, Taskina A, Liang J, Reijnders MJ, Ruzzante L, Feron R, Waterhouse RM, Wu Y, Mao C, Tu Z, Sharakhov IV, Fishman V. *Anopheles* mosquitoes reveal new principles of 3D genome organization in insects. *Nature communications*. 2022 Apr 12; 13(1):1-22; <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29599-5>; WoS, Scopus, IF=14.919;
2. Zamyatin A, Avdeyev P, Liang J, Sharma A, Chen C, **Lukyanchikova V**, Alexeev N, Tu Z, Alekseyev MA, Sharakhov IV. Chromosome-level genome assemblies of the malaria vectors *Anopheles coluzzii* and *Anopheles arabiensis*. *GigaScience*. 2021 Mar; 10(3): giab017; <https://doi.org/10.1093/gigascience/giab017>; WoS, Scopus, IF=6.524;

3. Compton A, Liang J, Chen C, **Lukyanchikova V**, Qi Y, Potters M, Settlege R, Miller D, Deschamps S, Mao C, Llaca V, Sharakhov IV, Tu Z. The beginning of the end: a chromosomal assembly of the New World malaria mosquito ends with a novel telomere. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 2020 Oct 1; 10(10): 3811-9; <https://doi.org/10.1534/g3.120.401654>; WoS, Scopus, IF=3.154

На диссертацию и автореферат поступило 5 отзывов, все положительные. Отзывы прислали:

1) Колесникова Т.Д. – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск. «На мой взгляд, было бы уместно добавить во введение, что 3D анализ генома позволяет решать множество важных прикладных задач, таких как повышение качества сборки геномов, выявление и картирование хромосомных перестроек, выявление полиморфизма по хромосомным перестройкам, поскольку все эти задачи автор решает в рамках своей работы. Кроме того, у меня сложилось впечатление, что сформулированная во введении цель существенно уже, чем набор решаемых задач. Еще одно замечание касается как автореферата, так и текста самой диссертации. Варваре Алексеевне следовало бы добавить описание объекта своего исследования – всех использованных в работе линий комаров. Не хватает информации о происхождении линий, откуда линии были получены непосредственно для данной работы. Особенно важной эта информация мне представляется для части работы, связанной с инверсионным полиморфизмом. Согласно выводу 4 «Геномы комаров рода *Anopheles* подразделяются на топологически ассоциированные домены со средним размером около 135 тысяч пар оснований». Не лучше ли для такого распределения смотреть не среднее, а медиану, ведь распределение ТАДов по размеру не нормальное? Если средний размер ТАДа существенно меньше Мб, чем обусловлено в выводе 5 отнесение всех «петель менее 1 млн пар оснований» к коротким петлям. На Рисунке 2 автореферата совсем не видно

надписи на шкалах, поэтому не понятен масштаб – одинаков он или разный на трех диаграммах».

2) Шарахов И.В. – д.б.н., старший научный сотрудник и профессор кафедры генетики и клеточной биологии федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет», г.Томск.

3) Шевелев Ю.Е. – к.б.н., заведующий лабораторией анализа регуляции генов ФГБУН Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт» г. Москва. «Следует отметить несколько незначительных недостатков, присутствующих в работе: 1) несколько описательный характер работы, 2) отсутствие количественного обсчета степени колокализации сигналов FISH на Рис. 6, 3) чересчур лаконичные подписи к рисункам (по крайней мере в автореферате), 4) встречающееся употребление жаргонизмов, например, такого: высокая «континуальность» сборок генома».

4) Артемов Г.Н. – к.б.н., доцент кафедры генетики и клеточной биологии, с. н. с. лаборатории экологии, генетики и охраны окружающей среды, и. о. заведующего кафедрой генетики и клеточной биологии Томского Государственного Университета, г. Томск.

5) Шарахова М.В. – к.б.н., н.с. лаборатории клеточной дифференцировки ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оба оппонента являются компетентными специалистами в области геномики, цитологии и цитогенетики, имеют публикации в ведущих биологических журналах и дали свое письменное согласие быть оппонентами. Ведущая организация является одним из

ведущих учреждений по изучению пространственной организации генома, структуры хроматина, структуры и динамика клеточного ядра, что позволяет произвести экспертную оценку полученных в диссертационной работе результатов.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований доказано, что в геноме комаров *Anopheles* присутствует ранее не описанный тип хроматиновых петель, который консервативен в пределах рода и образуется в результате контактов локусов хроматина на больших геномных расстояниях (дальние петли). Их возникновение не может быть объяснено активностью генов, расположенных в данных локусах, и связыванием оснований петель с белками группы Polycomb. Доказано, что хроматиновые домены и компартменты в интерфазном ядре малярийных комаров рода *Anopheles* определяются профилем генной экспрессии и эпигенетическими модификациями гистонов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что детально изучена пространственная организация хроматина в ядрах клеток у пяти видов малярийных комаров (*Anopheles coluzzii*, *An. merus*, *An. stephensi*, *An. atroparvus* и *An. albimanus*), включая различные уровни упаковки хроматина и паттерны контактов ДНК в пространстве клеточного ядра, что позволило показать консерватизм механизмов образования доменов и компартментов, а также описать новый тип петлевой организации генома.

Показано, что паттерн дальних контактов ДНК в клетках эмбрионов *Anopheles* задается компартментализацией эу- и гетерохроматина и особой организацией хромосомных территорий в пространстве интерфазного ядра, при которой происходит сегрегация теломерных и центромерных районов у разных полюсов клетки.

Показано, что в геноме комаров рода *Anopheles* можно выделить топологически ассоциированные домены с медианным размером 135 тыс. пар оснований (т.п.о), а также существенно более крупные хроматиновые домены прицентромерного и интеркалярного гетерохроматина, которые редко

контактируют с остальными локусами в геноме.

Показано, что наиболее многочисленными являются хроматиновые петли, которые ассоциированы с активностью белков группы Polycomb и образуются в результате контактов локусов хроматина как на близких ($<10^3$ т.п.о.), так и на дальних ($>10^3$ т.п.о.) геномных расстояниях.

Показано, что в геноме формируется не более десяти дальних петель, которые не ассоциированы с активностью белков группы Polycomb, являются уникальными для рода *Anopheles*, присутствуют в пространственной структуре хроматина клеток эмбрионов, а также в клетках фолликулярного эпителия и питающих клетках яичников самок малярийных комаров. Показано также, что принципы укладки хроматина, не связанные с формированием дальних хроматиновых петель, консервативны для всех пяти исследуемых видов малярийных комаров рода *Anopheles* и имеют высокую степень сходства с пространственной организацией генома у представителей рода *Drosophila*.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработан новый протокол метода захвата конформации хромосом (Hi-C), оптимизированный для применения на эмбрионах *Anopheles*, который позволяет проводить поиск и анализ хромосомных перестроек, а также картировать точки разрывов хромосом с разрешением в 5 т.п.о., в том числе у комаров *Culex* и *Aedes*, где применение стандартных цитогенетических подходов затруднено по причине сложности получения препаратов политенных хромосом.

С использованием Hi-C-технологии впервые получены сборки геномов на хромосомном уровне для видов *An. coluzzii*, *An. merus* и *An. stephensi*, а также существенно улучшены сборки для *An. atroparvus* и *An. albimanus*. Информация о них доступна в международной базе данных NCBI BioProject (PRJNA660041: GCA_016508615.1, GCA_017562075.2, GCA_017562265.1, GCA_015501955.1, GCA_015501965.1) и может быть использована широким кругом исследователей.

Данные, полученные в диссертационной работе, могут быть использованы в научно-исследовательских организациях, связанных с изучением пространственной архитектуры ядра, механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов на хромосомном уровне, при решении практических задач, связанных с анализом инверсионных полиморфизмов у малярийных комаров и их распространением в природных популяциях, а также в образовательном процессе при чтении курсов лекций по геномике, эволюционной биологии, цитогенетике и клеточной биологии.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован широкий набор современных молекулярно-генетических методов, включающий полимеразную цепную реакцию с градиентом температур и без, гель-электрофорез в агарозном/полиакриламидном геле, выделение ДНК, РНК и белков, иммунопреципитацию хроматина с последующим секвенированием, вестерн блот-анализ и иммуноокрашивание. Для получения тепловых карт пространственных контактов геномов оптимизирован протокол приготовления Hi-C-библиотек и библиотек после иммунопреципитации хроматина, выполнена подготовка проб ДНК и РНК для проведения секвенирования нового поколения. Для установления точных границ хромосомных перестроек проведен анализ тепловых карт контактов в приложении Juicebox. Для подтверждения наличия дальних хроматиновых взаимодействий использована флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH). Подготовка специфических флуоресцентных проб проведена методом ник-трансляции и ПЦР-опосредованными методами.

Оценка достоверности результатов исследования выявила их высокую надежность, которая подтверждается использованием широкого набора дополняющих друг друга независимых методов – молекулярно-генетических, цитогенетических и биоинформатических. Интерпретация результатов, касающихся ключевых принципов укладки хроматина у комаров рода *Anopheles*, а также природы дальних хроматиновых петель, учитывает данные, полученные другими исследователями по рассматриваемой

тематике. Результаты работы получены на сертифицированном оборудовании для методов захвата конформации хромосом и иммунопреципитации хроматина, FISH, полногеномного секвенирования и микроскопии, и могут быть использованы другими исследователями. Достоверность полученных данных подтверждается наличием достаточного количества повторностей при проведении экспериментов.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в планировании и проведении большинства молекулярных и клеточных экспериментов, включая оптимизацию протокола и проведение Hi-C для эмбрионов *Anopheles*, FISH-эксперименты, иммуноокрашивание антителами, иммунопреципитацию хроматина, выделение РНК и приготовление РНК-библиотек, анализ треков распределения гистоновых меток и активности транскрипции в геномах *Anopheles*, анализ карт пространственных контактов геномов у *Anopheles* и *Aedes*, культивирование клеточной линии MSQ43, а также участии в обработке и интерпретации экспериментальных данных, апробации результатов исследования и подготовке публикаций. Основные результаты получены автором самостоятельно. Биоинформатическая обработка данных выполнена м.н.с. М.А. Нуриддиновым, карты контактов – к.б.н. И.И. Брусенцовым, отдельные технические задачи – А.К. Таскиной и к.б.н. В.С. Фишманом (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск), анализ транскриптомов и эпигенетических профилей – м.н.с. П.С. Белокопытовой (НГУ, Новосибирск), анализ BUSCO – сотрудниками лаборатории Р. Уотерхауса (Лозанна, Швейцария), Hi-C-библиотеки для *Aedes* подготовлены совместно с Д. Лиангом (Virginia Tech, США).

Полученные соискателем научные результаты соответствуют специальности 1.5.22. – клеточная биология (биологические науки).

В ходе защиты диссертации критических замечаний высказано не было. Соискатель Лукьянчикова В.А. аргументировано ответила на все задаваемые ей в ходе заседания вопросы.

На заседании 26 октября 2022 г. диссертационный совет принял решение присудить Лукьянчиковой В.А. учёную степень кандидата биологических наук за решение научной задачи, связанной с анализом принципов и особенностей укладки хроматина в интерфазном ядре у представителей малярийных комаров рода *Anopheles* и разработкой методических подходов для картирования хромосомных перестроек в сложных геномах больших размеров, характерных для комаров родов *Culex* и *Aedes*.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 7 докторов наук по специальности 1.5.22. – клеточная биология, участвовавших в заседании, из 27 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 21, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

Зам. председателя
диссертационного совета,
Академик РАН, д.б.н.



Handwritten signature of A.V. Kochetov

А.В. Кочетов

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Handwritten signature of T.M. Khlebodarova

Т.М. Хлебодарова

26.10.2022 г