

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

На диссертационную работу Рыжковой Анастасии Сергеевны «Трёхмерная организация генома эритробластов мыши на поли- и ортохроматической стадиях терминальной дифференцировки», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22. – «клеточная биология».

Актуальность темы исследования

Тема 3D-организации хроматина развивается уже около 20 лет, и особенно бурно после появления технологий секвенирования нового поколения (NGS), которые позволили расширить исследования до масштабов генома. Всё, что касается пространственного распределения ДНК в ядре эукариотической клетке, безусловно, имеет важное значение для современной биологии, так как определяет упаковку, реализацию генетического материала, и как следствие, функции и тип клетки. Расшифровка геномов различных организмов даёт представление о линейном положении генов, однако технологии 3С позволяют получить информацию о статусе хроматина (открытый/закрытый), о топологически-ассоциированных доменах, об отдельных событиях взаимодействий промотор-энхансер. Сравнительный анализ пространственной организации хроматина различных типов клеток необходим для ясного понимания механизмов реализации генов в онтогенезе. С другой стороны, межвидовые различия позволяют проследить эволюцию таких процессов. Диссертация Рыжковой А. С. посвящена изучению 3D-организации хроматина, а также распределению некоторых архитектурных белков в эритроблестах мыши на поли-/ортохроматической стадиях дифференцировки, то есть на заключительных стадиях созревания эритроцитов. Кроме того, с использованием доступных данных Hi-C, полученных на эритроблестах других животных, проведён сравнительный анализ.

Научная новизна, достоверность и значимость результатов.

Результаты, полученные, Рыжковой А.С. являются новыми и безусловно имеют важное значение для фундаментальной науки. Наличие необходимых контролей на всех этапах работы не оставляет сомнений в достоверности и значимости результатов. Выводы являются обоснованными и подтверждаются экспериментальными данными. Впервые показано, что эритробласты мыши на поздних стадиях дифференцировки не имеют классических топологически-ассоциированных доменов, но при этом, наблюдается увеличение частоты межгеномных контактов на расстоянии 25-30 Мб. Анализ распределения регуляторных белков CTCF, когезина и конденсина II хорошо дополняет и украшает работу. Выяснено, что на поли-/ортохроматической стадиях дифференцировки эритробластов, CTCF значительно снижает связывание с хроматином, в сравнении с типичными интерфазными клетками (фибробластами). Наличие такого контроля усиливает надёжность полученных результатов, и стирает сомнения в том, что процедура ChIP по какой-то технической причине могла пройти не эффективно. В то же время, другой белок, участвующий в ремоделировании хроматина – когезин – продолжает на том же уровне связываться с ДНК, при этом сайты связывания остаются те же, несмотря на почти полное отсутствие CTCF. Кроме того, автором диссертации была высказана и проверена гипотеза об участии конденсина II в компактизации хроматина на изучаемой стадии дифференцировки. Честное описание результатов, которые опровергают гипотезу, без лишних попыток обработки и демонстрации данных Hi-ChIP в угоду высказанной идее, вызывает уважение и увеличивают доверие к остальным результатам работы. Наконец, сравнительный анализ полученных Hi-C данных, с опубликованными для ядерных эритроцитов представителей различных классов позвоночных показал, что описанная архитектура хроматина в подобных клетках эволюционно консервативна. Главными

отличиями таких клеток является отсутствие ТАДов, а также присутствие характерной второй диагонали на картах геномных контактов.

Структура и содержание диссертации.

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 293 ссылки на первоисточники. Работа написана понятным языком, легко читается, изложена на 121 странице, содержит 28 рисунков и 2 таблицы. Обзор литературы даёт возможность погрузиться в тему, не имея предварительных специфических знаний, изложение начинается с общей теории о хроматине, далее постепенно сужаясь до темы исследования. Представлены современные данные о типах хроматина, о его функциональных единицах и об основных факторах, участвующих в организации его 3D-структуры. В конце литературного обзора даётся представление об эритроидной дифференцировке и о ранее проведённых исследованиях в этой области с применением метода Hi-C. Раздел «Материалы и методы» подробно описывает методики, которые применялись в работе, начиная с базовых типа вестерн-блота, заканчивая сложными процедурами проведения Hi-C с последующей подготовкой библиотек ДНК для NGS-секвенирования. Протоколы из этого раздела при необходимости могут быть использованы для проведения подобных работ. В разделе «Результаты» автор последовательно описывает полученные данные. В качестве источников поздних эритробластов использовались как *in vitro* дифференцированные эмбриональные эритроидные клетки, так и полученные из костного мозга взрослых животных. Наличие двух источников материала, безусловно, усиливает работу. Также представлены убедительные сведения о контроле качества данных Hi-C. Далее описываются особенности организации хроматина – наличие А-/В-компартов, отсутствие «дальних» контактов более 50 Мб, примечательное отсутствие ТАДов, наличие локального пика частот контактов на расстоянии 25-30 Мб между локусами. Отдельным блоком

работ выступают исследования распределения белков CTCF, когезина и конденсина II в геноме исследуемых клеток. Несомненно, в контексте диссертации это очень важные данные, которые делают работу полной. Наконец, раздел завершается межвидовым сравнительным анализом подобных клеток. В разделах «Обсуждение» и «Заключение» автор кратко перечисляет полученные результаты и обсуждает их значение в контексте уже выполненных исследований по данной теме. Следует отметить глубокую осведомлённость о том, что уже сделано в данной области, и какие пробелы восполняют результаты диссертации. В разделе «Выводы» автор подводит итог своих исследований, перечисленные выводы обоснованы и убедительны.

Замечания

Во время прочтения работы возникло несколько замечаний, вопросов и пожеланий:

- 1) Ввиду некоторых сходных черт между организацией хроматина в эритроблестах на поздних стадиях дифференцировки и митотическими клетками, логично было бы провести анализ на клеточный цикл, чтобы убедиться в том, что подавляющее большинство эритробластов находится в интерфазе. Рисунок 8 указывает на данный факт, но с наличием данных по процентному соотношению стадий G0-G1, G2-M и S, работа была бы полнее.
- 2) Учитывая отрицательный результат с участием конденсина II в компактизации хроматина поздних эритробластов, считает ли автор возможным провести какие-либо дальнейшие эксперименты, направленные на выяснение механизмов такой упаковки ДНК? Видит ли автор параллель с митозом или же считает, что в этом задействован иной механизм упаковки хроматина?

- 3) Учитывая остаточную транскрипцию на некоторых локусах в данном типе клеток, предпринимались ли попытки поиска локальных ТАДов в районах транскрибирующихся генов? Иными словами, является ли отсутствие ТАДов, описанное в работе повсеместным, или же отдельные события возможны?
- 4) На странице 38 есть фраза «геном плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) обладает рядом уникальных характеристик». Вероятно, диссертант имел ввиду эпигенетические и пространственные характеристики генома ПСК. Геном, как совокупность генетического материала вряд ли имеет много отличий, в сравнении с другими типами клеток.
- 5) В ходе хроматин-иммунопреципитации на 5 мкг антител было использовано около 40 мкг хроматина, то есть около 6 млн клеток. По опыту оппонента, для одной реакции ChIP с использованием хроматина из клеток мыши, достаточно 1 млн клеток на 5 мкг антител. Такое соотношение также даёт данные хорошего качества и при последующем NGS-секвенировании.
- 6) В названии и в теле диссертации используется словосочетание «эритробласты мыши на поли- и ортохроматической стадиях». Примерно до середины работы складывалось ощущение, что будет проведён сравнительный анализ этих двух стадий. Возможно, логичнее было бы использовать фразу «поли-/ортохроматические», которая встречается на стр. 65.
- 7) На странице 66 указывается, что распределение геномных контактов поли- и ортохроматических эритробластов сходное. А каковы в целом отличия этих двух типов клеток, и почему их рассматривают отдельно? На рисунке 10 их разделение выглядит весьма условным.
- 8) Выполнялся ли поиск de novo мотива для данных ChIP-seq? Наблюдались ли какие-то отличия в сравнении с типичными интерфазными клетками? К примеру, обнаруживается ли

классический «СССТС»-мотив при анализе оставшихся 546 пиков для фактора CTCF?

Перечисленные замечания несколько не снижают значение и важность работы. Диссертация выполнена на действительно высоком мировом уровне и расширяет наши представления по теме. Подтверждением этому служат статьи, опубликованные автором в авторитетных международных изданиях.

Таким образом, диссертационная работа Рыжковой Анастасии Сергеевны «Трёхмерная организация генома эритробластов мышцы на поли- и ортохроматической стадиях терминальной дифференцировки» является законченной работой, отвечающей требованиям ВАК п.п. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» (утверждено постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. N 842 с изменениями Постановления правительства РФ от 20.03.2021 г. N 426), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Рыжкова Анастасия Сергеевна, заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – клеточная биология.

Кандидат биологических наук по специальности
03.01.03 «Молекулярная биология»

Бахмет Евгений Игоревич

Старший научный сотрудник

Руководитель группы Динамики плюрипотентности

Лаборатория Молекулярной биологии стволовых клеток

ФГБУН Институт Цитологии РАН

Адрес: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4

Email: e.bakhmet@incras.ru, телефон: +7(911)834-7913

