

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу
Рыжковой Анастасии Сергеевны

«Трехмерная организация генома эритробластов мыши на поли- и ортохроматической стадиях терминальной дифференцировки»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – клеточная биология (биологические науки)

Актуальность темы диссертационного исследования

Созревание эритроцитов из клеток-предшественников представляет собой сложный многоступенчатый процесс, сопровождающийся глобальными изменениями в организации генома и клеточной структуры, вплоть до полного исчезновения некоторых органелл. Несмотря на активное исследование процессов клеточной дифференцировки, многие аспекты этой проблемы остаются неизученными. Так, не ясно, по каким регуляторным механизмам осуществляется компактизация хроматина в ядрах поздних эритробластов, сопровождающаяся изменением экспрессии генов. Невыясненным остается вопрос, как происходит созревание эритроцитов у видов животных, ядра которых не подвергаются экструзии и находятся в клетках в компактизованном состоянии. Для решения этой сложной проблемы Рыжкова Анастасия Сергеевна поставила цель охарактеризовать закономерности пространственной организации генома в терминальных эритробластах мыши и оценить роль архитектурных белков (СТСФ, когезин и конденсин) в ее формировании. Постановка данной научной цели является актуальным исследованием в современной клеточной биологии, так как позволяет раскрыть некоторые закономерности клеточной дифференцировки, в частности таких важных элементов крови, как эритроциты.

Структура и основное содержание диссертации

Диссертационная работа Рыжковой А.С. изложена на 121-й странице машинописного текста и состоит из списка сокращений и терминов,

Диссертационная работа Рыжковой А.С. изложена на 121-й странице машинописного текста и состоит из списка сокращений и терминов, введения, обзора литературы, материалов и методов, 3-х глав результатов, обсуждения, заключения, выводов, приложения и списка литературы. Работа иллюстрирована 27 рисунками и 2 таблицами. Список литературы содержит 299 источника.

Во введении автор обосновывает актуальность тематики проведенной работы, приводит информацию о степени разработанности решаемой научной проблемы, четко формулирует цель и задачи исследования, подчеркивает их научную новизну, а также обозначает теоретическую и практическую значимость исследования, описывает методы диссертационной работы. Основные положения, выносимые на защиту, отражают результаты исследования и возражений не вызывают. Далее следует информация об апробации результатов и публикациях, вкладе автора, краткая информация о структуре и объеме работы.

В главе «Обзор литературы» автор представляет современные данные о структуре хроматина, его типах, а также некоторых функциональных единицах хроматина. Рассматриваются механизмы, координирующие территориальную организацию хромосом, ламино-ассоциированных доменов. Отдельной главой представлен анализ развития технологий в области 3D-геномики, в частности приводится Hi-C метод, позволяющий получить полногеномную карту взаимодействий локусов, а также другие методы, такие как GAM и SPRITE, которые позволяют картировать взаимодействия между тремя и более локусами одновременно. Следующие три подглавы обзора посвящены анализу механизмов формирования геномной организации, организации хроматина в плюрипотентных клетках и в ходе дифференцировки, а также эритроидной дифференцировки, что и является предметом настоящего исследования. В заключении к обзору литературы автор делает справедливый вывод, что геномная организация в поздних эритроблестах млекопитающих, находящихся на стадиях

дифференцировки, предшествующих выбросу ядра, остается малоисследованной проблемой, решение которой существенно продвинет наше понимание процессов созревания эритроцитов.

Во второй главе «Материалы и методы» подробно описаны используемые методы клеточной и молекулярной биологии, которые включали получение поли- и ортохроматических эритробластов костного мозга мышей C57Bl/6, выделение нуклеиновых кислот, белков, методы ПЦР, Вестерн-блот, подготовку библиотек, секвенирование нового поколения на платформе Illumina, получение ChIP-seq библиотек, иммуноокрашивание стадияспецифичных маркеров для экспериментов Hi-C. В работе проводился также биоинформатический анализ данных Hi-C. В целом, методы, используемые в работе, позволяют решить поставленную цель и задачи, результаты получены на достаточном количестве экспериментального и теоретического материала.

В главе 3 «Результаты» представлены собственные результаты о 3D-организации генома поли-/ортохроматических эритробластов костного мозга и эритробластов, дифференцированных *in vitro*. Автором получены Hi-C карты геномных контактов, из которых установлено, что организация хроматина поздних эритробластов мыши имеет нехарактерные для типичных соматических клеток черты, такие как: отсутствие топологически ассоциированных доменов и петель; увеличение частоты геномных контактов между локусами на расстоянии 10-30 Мб. Показана ярко выраженная компарментализация эу- и гетерохроматина и резкое снижение частоты контактов между локусами, разделенными более чем 50 Мб дистанцией, что свидетельствует о высокой степени компактизации их хромосом. Показано, что для поздних эритробластов мыши характерно снижение числа сайтов связывания белка CTCF в геноме, что согласуется с отсутствием в геноме исследуемых клеток ТАДов и петель. Другие белки, такие как когезин и конденсин II, также играющие роль в формировании структуры хроматина, по-видимому, не участвуют в формировании

геномных контактов. Показано, что отсутствие ТАДов и перестройка дальних геномных взаимодействий в поздних эритроблестах являются эволюционно консервативными у позвоночных

В главе 4. Рыжкова А.С. обсуждает особенности 3D-организации генома поли-/ортохроматических эритробластов костного мозга и эритробластов, дифференцированных *in vitro*, анализирует результаты распределения архитектурных белков CTCF, когезина и конденсина в геноме эритробластов. Она также обсуждает результаты по связыванию конденсина II с хроматином в ядрах поли-/ортохроматических эритробластов, проводит анализ консервативности специфической трехмерной организации эритроидных клеток позвоночных.

В заключении делается обобщающий вывод о том, что используемый Hi-C анализ пространственной структуры хроматина в поздних эритроблестах мыши позволил получить важные сведения о процессах, происходящих на уровне пространственной организации геномных контактов на заключительных стадиях эритроидной дифференцировки.

Обоснованность и достоверность научных положений, выводов и заключений диссертации

В соответствии с поставленной целью исследования — охарактеризовать закономерности пространственной организации генома в терминальных эритроблестах мыши и оценить роли архитектурных белков (CTCF, когезин и конденсин) в ее формировании, автором сформулированы и обоснованы задачи исследования. Их успешному решению во многом способствовало применение адекватных высокотехнологичных методических подходов. Выбранные методы исследования соответствуют поставленным задачам. Положения, выносимые на защиту, научно обоснованы, выводы логически вытекают из полученных результатов и являются непосредственным итогом проведенного Рыжковой А.С. исследования. Достоверность полученных результатов подтверждена

адекватно проведенным биоинформатическим анализом. По теме диссертации автором опубликовано 3 печатных работы в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией РФ. Результаты докладывались на 3-х международных научных конференциях.

Автореферат полностью отражает содержание диссертационной работы.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Многие результаты диссертационной работы Рыжковой А.С. были получены впервые. Так, впервые были охарактеризованы особенности трехмерной структуры генома эритробластов мыши на заключительных стадиях дифференцировки с использованием метода Hi-C. Было показано, что данные особенности в значительной мере отличают структуру их хроматина от структуры хроматина типичных интерфазных клеток. В диссертационной работе также впервые проведено картирование белков-организаторов хроматина, таких как CTCF, когезин и конденсин, в геноме поли-/ортохроматических эритробластов мыши. Показано, что связывание белка CTCF понижено в хроматине исследуемых клеток. Также, впервые показано, что наблюдаемые особенности пространственной структуры генома эритроидных клеток в финале их дифференцировки, то есть отсутствие ТАДов и перестройка более дальних хроматиновых взаимодействий, формирующая структуру, напоминающую на картах Hi-C вторую диагональ, эволюционно консервативны.

Теоретическая и практическая значимость полученных автором результатов

Диссертационное исследование Рыжковой А.С. позволяет расширить наши представления о трехмерной организации генома эритроидных клеток. Понимание механизмов реорганизации хроматина данных клеток важно с точки зрения связи структуры генома и регуляции экспрессии генов.

Автором также получены оригинальные результаты о консервативности структуры генома эритроцитов среди позвоночных.

Замечания и рекомендации

Не вызывает сомнения, что автором получены оригинальные и интересные результаты о трехмерной организации генома эритроидных клеток. Принципиальных замечаний к диссертационной работе Рыжковой А.С. нет. При прочтении работы у меня возникли вопросы для дискуссии:

1. Известно, что в процессе клеточной дифференцировки меняются профили метилирования генома. В связи с этим возникает вопрос, как меняется реорганизация хроматина в этом случае?
2. Что известно о сайтах связывания исследуемых белков-организаторов хроматина, насколько они специфичны и консервативны?

Заключение

Диссертационная работа Рыжковой Анастасии Сергеевны «Трехмерная организация генома эритробластов мыши на поли- и ортохроматической стадиях терминальной дифференцировки», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – клеточная биология (биологические науки) является законченной, самостоятельной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная проблема, имеющая существенное фундаментальное значение для клеточной биологии, а именно, исследованы механизмы геномной реорганизации в ядре терминальных эритробластов и выявлены функциональные особенности взаимодействий комплекса когезина, а также фактора CTCF с хроматином. По объему и методологическому уровню выполненных исследований, научной новизне, практической значимости, достоверности полученных результатов и выводов диссертационная работа Рыжковой А.С. полностью соответствует требованиям ВАК п. 9 «О порядке

присуждения ученых степеней» Постановления Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842 (в ред. Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. № 335, от 01.10.2018 г. №1168, с изменениями от 11.09.2021 г.), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.22 – клеточная биология (биологические науки), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени.

Официальный оппонент:

Руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»
д.б.н., профессор

 Л.Ф. Гуляева

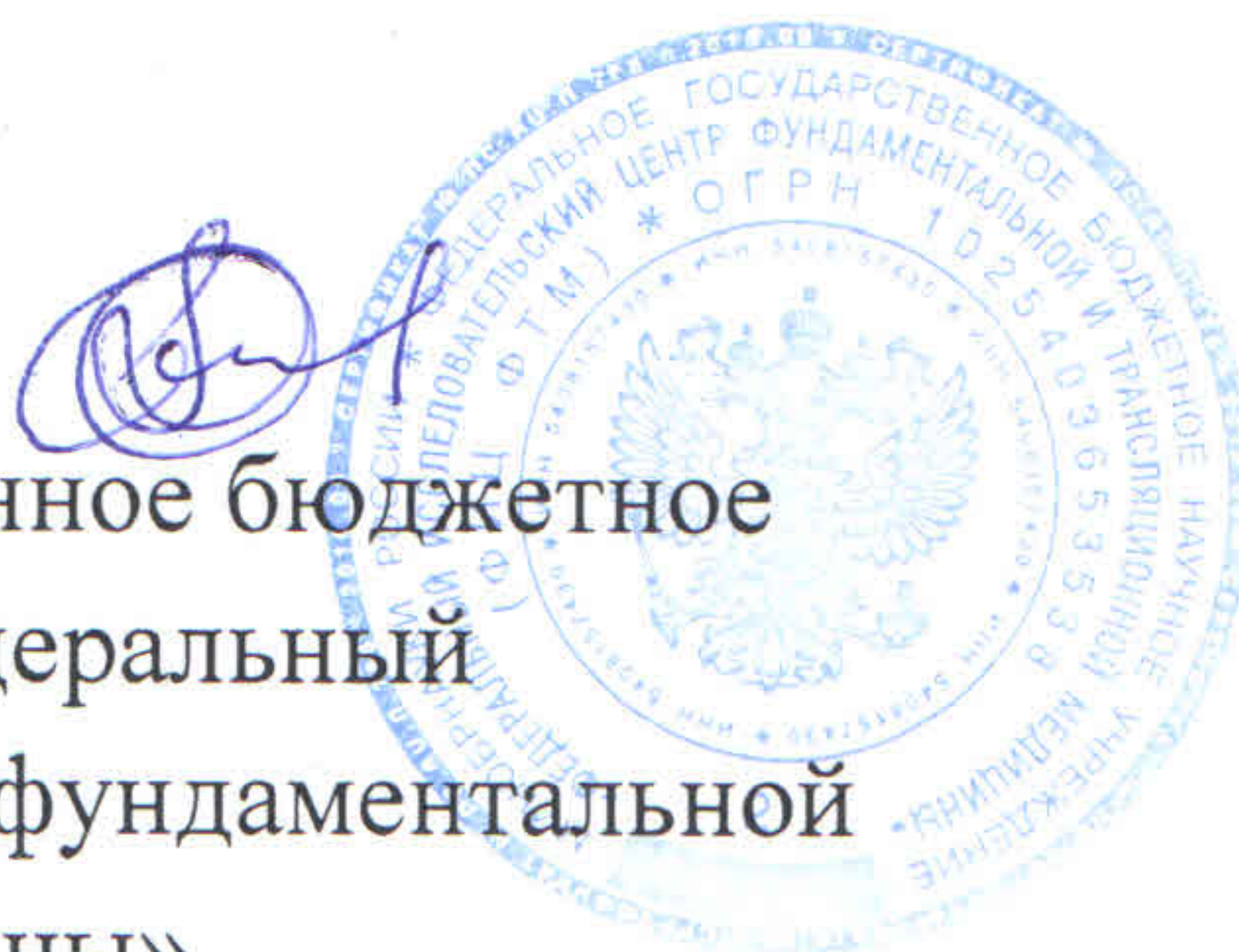
Дата: «23» января 2023г.

Подпись д.б.н., профессора Л.Ф. Гуляевой

Заверяю:

Начальник Отдела кадров
Минеева О.М.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»



Дата: «23» января 2023г.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

630117, Россия, Новосибирская область, г. Новосибирск, улица Тимакова, 2
Телефон: +7 (383) 274-95-80. E-mail: director@frcftm.ru. Сайт: www.frcftm.ru