

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

**ИНСТИТУТ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ И КЛЕТОЧНОЙ
БИОЛОГИИ**

СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИМКБ СО РАН)

пр. Академика Лаврентьева, д. 8/2, Новосибирск, 630090

телефон (383) 3639042, факс (383) 3639078

e-mail: info@mcb.nsc.ru

<http://www.mcb.nsc.ru>

ОКПО 30781167, ОГРН 1115476157070,

ИНН / КПП 5408291757 / 540801001

№ 15318-06-6215/06

На № _____ от _____



УТВЕРЖДАЮ
Директор ИМКБ СО РАН
Д.б.н. Демаков Сергей
Анатольевич
«30» января 2023 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации 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 исследования

В последние годы исследования трехмерной организации ядра и ее связи с регуляцией экспрессии генов очень активно изучается. Важнейшим вопросом является анализ реорганизации пространственной организации генома во время клеточной дифференцировки. При эритроидной дифференцировке млекопитающих происходят наиболее катастрофические события – полная элиминация клеточного ядра, в то время как у амфибий, рептилий и птиц ядро сохраняется, но существенно реорганизуется. Анализ этих процессов в динамике дает очень важную новую информацию о механизмах реорганизации ядра и ее связи с генной экспрессией. Полученные в работе данные показывают, что эритробласты мыши характеризуются

необычной геномной архитектурой: в них отсутствуют топологические домены, но есть выраженная компарментализация. Также показано, что такая необычная организация связана с уходом с хроматина одного из ключевых организаторов – CTCF. Таким образом, работа Анастасии Рыжковой – очень актуальное и интересное научное исследование.

Научная новизна и значимость полученных автором результатов для науки и практики

В диссертационной работе Анастасии Сергеевны Рыжковой впервые охарактеризованы особенности трехмерной структуры генома эритробластов мышцы на заключительных стадиях дифференцировки. Также, впервые показано, что наблюдаемые особенности пространственной структуры генома эритроидных клеток в финале их дифференцировки эволюционно консервативны. Эти результаты способствуют лучшему пониманию особенностей трехмерной организации генома эритроидных клеток. Исследование механизмов реорганизации их хроматина является важным шагом на пути к пониманию глобальных закономерностей связи структуры генома и регуляции генной активности.

Степень обоснованности и достоверности полученных положений и выводов

Достоверность полученных результатов основывается на применении адекватных поставленным задачам современных цитологических и молекулярно-генетических методов. Исследование проведено на достаточном количестве материала, результаты хорошо проиллюстрированы, осмыслены и подробно обсуждены. Выводы полностью обоснованы совокупностью приведенных данных и соответствуют поставленным задачам.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Рыжковой А.С. представляет собой законченное научное исследование, изложенное и оформленное согласно требованиям, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Диссертация построена по классическому плану, включает в себя введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы и список литературы (293 источника). Общий объем составляет 121 страницы, в том числе 2 таблицы, 27 рисунков и приложение.

В разделе «Введение» кратко охарактеризована актуальность проблемы, четко сформулированы цели и задачи исследования, описаны научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, кратко перечислены основные методы исследования, а также приведены положения,

выносимые на защиту, сведения о степени личного вклада автора, данные об апробации результатов и о публикациях по теме диссертационной работы. Также приведен список сокращений и терминов.

Глава «Обзор литературы» состоит из 6 подразделов. В первом подразделе приведен емкий и глубокий обзор современных представлений об организации хроматина в эукариотических клетках. В этой области в последние годы факты накапливаются с огромной скоростью, постоянно меняются главенствующие концепции. В обзоре литературы Анастасия Сергеевна провела глубокий критический анализ материала. Есть отдельный подраздел, посвященный классификации типов хроматина. В нем вводятся понятия «эу-» и «гетерохроматин», после чего подробно рассказывается о выделении пяти базовых типов хроматина у дрозофилы. Возможно, было бы уместно несколько расширить этот раздел, добавив обсуждение базовых типов хроматина (гиперацетилованный/нуль/HP1/Polyscomb) у позвоночных, так как диссертационная работа А. С. Рыжковой посвящена исследованию хроматина у позвоночных. В подразделе «Некоторые функциональные единицы хроматина» вводятся понятия хромосомных территорий и ЛАДов. Мне показалось интересным обсуждение радиальной организации хромосомных территорий и консервативности такой организации, в то же время мне осталось не совсем понятным, что конкретно подразумевается под радиальной организацией. Имеется ли в виду Рабль-ориентация хромосом, или что-то другое. В разделе про ЛАДы Анастасия Сергеевна детально описывает результаты первых экспериментов по характеристике ЛАДов, приводит характерные размеры полученных в этой работе ЛАДов, при этом не упоминает, что эти эксперименты проводились на клетках дрозофилы. Это важно, так как у дрозофилы размеры ЛАДов отличаются от таковых у позвоночных. Следующая часть обзора литературы посвящена различным технологиям в области 3D геномики. Здесь Анастасия Сергеевна обсуждает преимущества «классических» 3С-подходов и новых подходов, появившихся в последние несколько лет. Этот раздел написан очень хорошо и понятно, но мне было бы интересно больше узнать о пределе разрешения этих методов, например, для метода GAM. В разделе «интерпретация данных 3С-методов: уровни организации хроматина» очень информативно и интересно рассказывается, какие представления о трехмерной организации генома сформировались на основании анализа данных Hi-C. При чтении раздела про компартменты у меня возник вопрос – что такое размер компартмента, если каждый компартмент – объединение существенной части генома. Также у меня возник вопрос по определению ТАДа: как определяется ТАД в

индивидуальных клетках, если понятие ТАДа подразумевает некую вероятностную характеристику. Следующий подраздел называется «Механизмы формирования геномной организации». Этот очень интересный раздел посвящен молекулярным и биофизическим механизмам формирования ТАДов и компартментов. Мне показалось, что заголовок раздела не очень удачный, так как остается не понятным, что такое в данном контексте «геномная организация». Также мне не понятно выражение «плотное взаимодействие». Следующий раздел рассказывает о роли отдельных белков в формировании пространственной организации хроматина. Последняя часть обзора литературы посвящена описанию хроматина в клетках эритроидного ряда и подробно рассказываются все имеющиеся на сегодня литературные данные об исследованиях трехмерной организации и ее динамики в ходе эритроидной дифференцировки. В заключении к обзору литературы Анастасия Сергеевна четко обосновывает актуальность дальнейших работ по исследованию трехмерной организации хроматина в этом процессе и актуальность поставленных в диссертационной работе задач.

В главе «Материалы и методы исследования» приводится исчерпывающее и при этом очень ясно сформулированное описание использованных в работе методов. Глава показывает высокую квалификацию автора, очень широкий спектр методов, от методов молекулярной генетики, геномики и иммуноцитохимии, до изолированной и трудоемкой работы с выделением эритробластов из костного мозга и эмбриональной печени мышей, а также направленной дифференцировкой клеток.

Глава 3 «Результаты» состоит из трех частей. Подглава 3.1 посвящена исследованию 3D-организации генома поли-/ортохроматических эритробластов костного мозга и эритробластов, дифференцированных *in vitro*. С помощью метода Hi-C проводится анализ структуры хроматина в эритроблестах. Обнаружено сходство в распределении геномных контактов в ядрах поли- и ортохроматических эритробластов, а также специфических особенности, характерные для каждого типа клеток. По результатам этой главы Анастасия Сергеевна делает вывод, что организация хроматина поздних эритробластов мыши имеет нехарактерные для типичных соматических клеток черты: отсутствие топологически ассоциированных доменов и петель; увеличение частоты геномных контактов между локусами на расстоянии 10-30 Мб. Кроме того, для пространственной организации генома поздних эритробластов характерна ярко выраженная компартментализация эу- и гетерохроматина и резкое снижение частоты контактов между локусами, разделенными более чем 50 Мб дистанцией, что свидетельствует о высокой

степени компактизации их хромосом. В подглаве 3.2 Анастасия Сергеевна описывает результаты исследования распределения архитектурных белков – CTCF, когезина и конденсина в геноме эритробластов. На основании этих результатов делается вывод, что для поздних эритробластов мыши характерно значительное снижение числа сайтов связывания белка CTCF в геноме. При этом когезин остается связанным с хроматином эритробластов, но по-видимому не принимает участия в формировании геномных контактов, ввиду отсутствия выраженных петлевых структур на уровне <1 Мб. Анализ геномных контактов, опосредованных конденсином II методом HiChIP не подтвердил гипотезу о том, что конденсин II играет ключевую роль в увеличении частоты геномных контактов между локусами на расстоянии 10-30 Мб в поздних эритробластах мыши.

Последняя часть результатов посвящена анализу консервативности трехмерной организации эритроидных клеток позвоночных. В этой очень интересной главе проводится сравнение результатов автора с литературными данными по исследованию трехмерной организации в клетках, проходящих эритроидную дифференцировку у других групп позвоночных. Показывается консервативность уникальной трехмерной организации в эритроидных клетках.

Основные результаты диссертационной работы и их обсуждение изложены в соответствии с поставленными задачами. Рисунки наглядно демонстрирующие полученные данные.

В Главе «Обсуждение» Анастасия Сергеевна подводит итоги проведенному анализу, еще раз перечисляет и анализирует признаки, отличающие трехмерную организацию генома в поздних эритробластах, описывает молекулярные механизмы, потенциально способные объяснить появление нехарактерных для интерфазных клеток особенностей организации генома поздних эритробластов. В частности, обсуждается сходство с организацией хроматина в метафазных хромосомах. Обоснованно выдвигается гипотеза о возникновении необычной трехмерной организации генома вследствие неполной деконденсации хромосом в ходе быстрых митотических делений.

В главе «Заключение» автор суммирует полученные данные и намечает перспективы дальнейших исследований.

В разделе «Выводы» автор четко формулирует выводы исследования, которые соответствуют поставленным целям и задачам и отражают результаты проведенной работы.

Список литературы содержит 293 ссылок, из которых 30% - это ссылки на работы, опубликованные за последние 5 лет.

Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертационной работы оформлен по стандартной схеме и соответствует установленным требованиям. Материал автореферата точно и достоверно отражает результаты проведенных исследований, дает полное представление о содержании диссертации.

Подтверждения опубликованных основных результатов диссертации в научной печати

Результаты работы были представлены на 2-х международных конференциях и опубликованы в 3-х рецензируемых российских и зарубежных журналах из перечня ВАК РФ, которые входят также в международную сеть Web of Science. Опубликованные работы полностью охватывают основные результаты диссертации.

Замечания и комментарии

Текст диссертации написан хорошим языком, грамотно и логично, однако встречаются жаргонизмы, особенно в главе «введение».

Иногда по тексту встречаются ссылки на литературные источники в разном формате. Например, (Vietri Rudan et al. 2015). (N. C. C. Durand et al. 2017).

Не все названия белков и растворов расшифрованы и присутствуют в списке сокращений, например, нет расшифровки для PFA, БСА, белка МСРН1.

Число ссылок, упомянутых при описании структуры и объема работы, не соответствует числу ссылок в диссертации.

В автореферате не упоминаются методы работы с культурами клеток и подход по индукции эритроидной дифференцировки, хотя направленная дифференцировка клеток - базовый метод, обеспечивающим специфику работы Анастасии Сергеевны.

Перечисленные замечания не умаляют достоинств диссертации, не влияют на достоверность полученных результатов и сделанных на их основе выводов.

Заключение

Диссертационная работа Рыжковой Анастасии Сергеевны «Трехмерная организация генома эритробластов мыши на поли- и ортохроматической стадиях терминальной дифференцировки» является оригинальной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне. В работе использованы самые современные молекулярно-биологические и

биоинформатические методы. Несомненными являются новизна, наглядность полученных результатов и обоснованность выводов работы. Основные результаты работы опубликованы в прести

жных международных журналах. По поставленным задачам, уровню их решения и новизне полученных результатов она полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842, представляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Рыжкова Анастасия Сергеевна, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности по специальности 1.5.22. - клеточная биология.

Отзыв заслушан и утвержден на заседании межлабораторного семинара Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук» (протокол № 1 от 18 января 2023 года).

Ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной цитогенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук

доктор биологических наук по специальности 03.01.07 - молекулярная генетика,

Колесникова Татьяна Дмитриевна

30.01.2023

Адрес: 630090, город Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, дом 8/2

Тел.: +7 (383) 373-02-49

Эл. адрес: kolesnikova@mcb.nsc.ru



Подпись *Колесникова Т. Д.*

Зав. канцелярией

ЗАВЕРЯЮ

«30»

2023г.