

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 15 февраля 2023 г. № 4

О присуждении Рыжковой Анастасии Сергеевне
(гражданка РФ)

ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация Рыжковой А.С. «Трехмерная организация генома эритробластов мыши на поли- и ортохроматической стадиях терминальной дифференцировки» по специальности 1.5.22. – клеточная биология (биологические науки) принята к защите 28.09.2022 г, протокол №23, 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: Рыжкова Анастасия Сергеевна, 18 июня 1994 года рождения. В 2015 году Рыжкова Анастасия Сергеевна окончила Новосибирский государственный университет по специальности «биология». В 2021 г. окончила очную аспирантуру ИЦиГ СО РАН. В период подготовки

диссертации соискатель Рыжкова Анастасия Сергеевна работала в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» в должности младшего научного сотрудника 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 Баттулин Нариман Рашитович, работает в должности ведущего научного сотрудника лаборатории генетики развития ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук».

Официальные оппоненты:

1. **Гуляева Людмила Федоровна**, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярных механизмов канцерогенеза, НИИ молекулярной биологии и биофизики, ФИЦ «Фундаментальная и трансляционная медицина» г. Новосибирск.
2. **Бахмет Евгений Игоревич**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток ФГБУН «Институт цитологии Российской академии наук», г. Санкт-Петербург.

Оппоненты дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация: ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск. В своем положительном отзыве, подписанном ведущим научным сотрудником, д.б.н. Колесниковой Татьяной Дмитриевной и утвержденном Директором ИМКБ СО РАН д.б.н. Демаковым Сергеем Анатольевичем,

указала что «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 престижных 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 ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН (протокол №1 от 18.01.2023 г)»

Соискатель имеет 10 опубликованных работ, из них по теме диссертации 6, общим объемом 29 страниц, из них 3 статьи в рецензируемых научных изданиях (Wos, Scopus) и 3 тезиса в материалах всероссийских и международных конференций. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем работах.

Наиболее значительные публикации по теме диссертации:

1. **Ryzhkova, A.**; Battulin, N. Genome reorganization during erythroid differentiation. Genes (Basel). 12(7), 1012 (2021). (WoS, Scopus, IF=4.141)

2. **Ryzhkova, A.**; Taskina, A.; Khabarova, A.; Fishman, V.; Battulin, N. Erythrocytes 3Dgenome organization in vertebrates. Sci. Rep. 11, 4414 (2021). (WoS, Scopus, IF=4.996)

3. А.А. Хабарова, **А.С. Рыжкова**, Н.Р. Баттулин. Реорганизация хроматина в процессе эритроидной дифференцировки. Vavilov journal of genetics and breeding. 23, № 1 (2019) РИНЦ, IF=1.02

На диссертацию и автореферат поступило 2 положительных отзыва. Отзывы прислали:

1) Орищенко К.Е. – к.б.н. заведующий лабораторией структурно-функциональной организации генома ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный государственный университет», г. Новосибирск. «По тексту автореферата есть незначительные замечания. На рисунке 1 не представлены данные попарного коэффициента корреляции для двух реплик эритробластов, дифференцированных в культуре.»

2) Киреев И.И. – д.б.н. заведующий отделом электронной микроскопии НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается тем, что оба оппонента являются компетентными специалистами в области клеточной биологии, 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 процессе клеточной дифференцировки эритробластов мыши происходит реорганизация пространственной структуры генома, которая характеризуется, с одной стороны, ярко выраженной компарментализацией эу- и гетерохроматина, а с

другой – отсутствием типичных для других соматических клеток топологически ассоциированных доменов (ТАДов) и хроматиновых петель, что свидетельствует о высокой степени компактизации хромосом.

Высказана оригинальная гипотеза, что особенности 3D-организации генома поздних эритробластов мыши обусловлены снижением в хроматине числа сайтов связывания архитектурного белка CTCF (CCCTC-binding factor).

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что детально исследованы и описаны особенности трехмерной структуры генома эритробластов мыши на заключительных стадиях их дифференцировки путем построения Hi-C карт и ChIP-seq анализа по картированию белков-организаторов хроматина – CTCF, когезина и конденсина II. **В результате впервые показано**, что в отличие от фибробластов в хроматине поздних эритробластов мыши наблюдается увеличение частоты геномных контактов между локусами на расстоянии 10-30 миллионов пар оснований (млн.п.о.) и их резкое снижение между локусами, разделенными дистанцией более чем в 50 млн.п.о. **Показано также**, что хроматин поздних эритробластов мыши не отличается от такового в фибробластах по содержанию когезина, но характеризуется значительным снижением числа занятых сайтов связывания белка CTCF и ассоциированных с ним структур – ТАДов и петель.

Проведен также анализ пространственной структуры генома эритроидных клеток с использованием опубликованных Hi-C данных ядерных эритроцитов у представителей разных классов позвоночных. **Доказано**, что уникальные особенности архитектуры генома эритробластов, наблюдаемые на конечной стадии их дифференцировки у мыши, эволюционно консервативны и присутствуют у других исследованных представителей позвоночных разных классов, включая лучеперых рыб (*Takifugu flavidus*, *Pelteobagrus fulvidraco*), земноводных (*Leptobrachium leishanense*, *L. ailaonicum*), рептилий (*Salvator meriana*, *Pelodiscus sinensi*), и птиц (*Casuaris casuaris*).

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что разработаны варианты протоколов

ChIP-seq и HiChIP, оптимизированные для применения на эритроблестах мыши, которые повышают точность картирования динамически связанных с хроматином белков. **Впервые** с использованием Hi-C-технологии **созданы** карты геномных контактов для поздних эритробластов мыши, полученных в ходе *in vitro* дифференцировки. Информация о них доступна в международной базе данных NCBI BioProject (PRJNA666472) 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, изменений эпигенетического ландшафта в ходе клеточной дифференцировки, а также – в образовательном процессе при чтении курсов лекций по геномике, клеточной биологии и эпигенетике.

Применительно к проблематике диссертации результативно использован набор современных молекулярно-генетических методов и методов клеточной биологии, включающий полимеразную цепную реакцию с градиентом температур и без, гель-электрофорез в агарозном геле, выделение ДНК и белков, вестерн блот-анализ, иммуноокрашивание, подготовку ДНК образцов для проведения секвенирования нового поколения, проточную цитофлюориметрию, а также получение первичных клеточных культур эритроидных предшественников эмбриональной печени мыши. Для построения карт геномных контактов в эритроблестах мыши использовали технологию Hi-C, для картирования сайтов связывания белков CTCF и когезина – ChIP-seq, для картирования геномных контактов, опосредованных конденсином – HiChIP. Данные ChIP-seq анализировали с помощью набора алгоритмов AQUAS, генерацию Hi-C карт осуществляли при помощи инструмента Juicer, для картирования границ ТАДов использовали инструменты Juicer, Armatus и TopDom. Применение перечисленных методов позволило получить максимально полную информацию о 3D-структуре генома поздних эритробластов мыши.

Оценка достоверности результатов исследования выявила их

высокую надежность, которая подтверждается использованием адекватных высокотехнологичных методов, как молекулярно-генетических, так и биоинформатических, которые перечислены выше. Более того, проведена оптимизация методов ChIP-seq и HiChIP для их применения на эритроблестах мыши, что привело к уменьшению уровня шума и повышению достоверности данных картирования сайтов связывания CTCF и когезина, а также геномных контактов с участием конденсина. Интерпретация экспериментальных данных, касающихся принципов организации хроматина в поздних эритроблестах мыши, а также механизмов формирования данной организации, согласуется с результатами, полученными другими исследователями в области 3D геномики. Достоверность полученных данных подтверждается также наличием достаточного количества повторностей при проведении экспериментов.

Личный вклад автора заключается в непосредственном участии в планировании и проведении большинства молекулярных и клеточных экспериментов (оптимизация методов и проведение экспериментов Hi-C, ChIP-seq, HiChIP, *in vitro* дифференцировка, иммуноокрашивание антителами), участии в обработке и интерпретации экспериментальных данных, включая анализ карт пространственных контактов, треков распределения гистоновых меток и архитектурных белков, а также апробации результатов исследования и подготовке публикаций. Основные результаты исследования получены автором самостоятельно.

Подготовка Hi-C библиотек из эритробластов костного мозга и ChIP-seq эксперимент на белок CTCF выполнены совместно с н.с. Хабаровой А.А. и м.н.с. Лукьянчиковой В.А; построение матриц контактов и идентификация компартментов – совместно с м.н.с. Нуриддиновым М.А., анализ данных ChIP-seq и Hi-C карт выполнены совместно с м.н.с. Белокопытовой П.С., в.н.с. Фишманом В.С. и бакалавром Таскиной А.К.

Полученные соискателем научные результаты соответствуют п. 1 «Изучение строения клеток и тканей и общих закономерностей генеза,

ультраструктурной организации и функции клеток эукариот, в том числе в составе тканей и органов» и п. 4 «Пространственная организация генома. Топологические домены генома. Структурно-функциональная и пространственная организация хромосом, их реорганизация в ходе эволюции, в онтогенезе и в ходе клеточной дифференцировки» паспорта специальности 1.5.22. – клеточная биология (биологические науки).

Диссертационным советом сделан вывод о том, что диссертация представляет собой законченную научно-квалификационную работу, соответствует критериям пункта 9, абзац 2 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденным постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842.

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

На заседании 15 февраля 2023 г. диссертационный совет принял решение присудить Рыжковой А.С. учёную степень кандидата биологических наук за решение научной задачи, связанной с выявлением принципов и особенностей пространственной организации хроматина в ядре эритробластов мыши на поли- и ортохроматической стадиях их дифференцировки.

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 человека, входящих в состав совета, проголосовали: за – 21, против – нет, недействительных бюллетеней – нет.

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

А.В. Кочетов

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова



15.02.2023 г