

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

член-корреспондента РАН, доктора биологических наук Графодатского Александра Сергеевича на диссертацию в форме научного доклада Фишмана В.С. "Трехмерная организация хроматина у животных и ее нарушения при хромосомных перестройках", представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.22 - клеточная биология, 1.5.8. - математическая биология, биоинформатика.

Актуальность темы исследования

Изучение трехмерной организации хроматина является одним из наиболее перспективных и динамично развивающихся направлений современной молекулярной биологии и геномики. В последние годы стало очевидно, что не только линейная последовательность ДНК, но и ее пространственная организация играет критическую роль в регуляции геномных процессов. Понимание того, как ДНК упакована в ядре клетки и как эта упаковка влияет на регуляцию генов, имеет фундаментальное значение для раскрытия механизмов клеточной дифференцировки, развития организма и возникновения различных заболеваний. Несмотря на значительные успехи в изучении 3D-генома у человека и модельных организмов, таких как мышь и дрозофилы, остается много неизученных аспектов, связанных с видовой специфичностью организации хроматина, ее эволюцией и влиянием на функциональные процессы. Значительная часть диссертационной работы направлена на изучение этих важных аспектов биологии хроматина. Исследование организации хроматина в клетках домашней курицы позволяет проследить эволюцию геномной организации и эпигенетических механизмов регуляции. Кроме того, курица является важным сельскохозяйственным объектом, и понимание ее геномной организации может иметь прикладное значение для селекции и биотехнологии.

Комары рода *Anopheles* являются основными переносчиками малярии, одного из наиболее опасных инфекционных заболеваний в мире. Понимание геномной организации и регуляции генов у этих видов может способствовать разработке новых стратегий борьбы с малярией и другими трансмиссивными заболеваниями.

Изучение механизмов формирования ТАДов и компартментов у различных видов позволяет выявить общие и специфические механизмы регуляции генома, что имеет важное значение для эволюционной биологии и геномики. Различия в механизмах формирования ТАДов у млекопитающих (с участием белков CTCF и когезина) и у дрозофилы (с меньшей ролью CTCF) подчеркивают необходимость исследования других видов, чтобы понять универсальность этих процессов и их эволюционную историю.

Исследование изменений трехмерной организации хроматина в процессе клеточной дифференцировки, в частности, при созревании эритроцитов у курицы, позволяет понять, как эпигенетические механизмы влияют на специализированную функцию клеток. Это важно не только для фундаментальной биологии, но и для медицины, так как нарушения этих процессов могут приводить к заболеваниям крови и иммунной системы.

Наконец, разработка методов детекции хромосомных перестроек, основанных на технологии захвата конформации хромосом, является актуальным направлением в контексте медицинской генетики.

Научная новизна

Диссертационная работа Вениамина Семеновича представляет собой значительный вклад в область геномики и эпигенетики, сочетая исследование малоизученных объектов с применением современных и инновационных методов анализа. Научная новизна работы проявляется в нескольких ключевых аспектах.

Во-первых, это касается оригинальности объектов исследования. Домашняя курица несмотря на то, что является важным сельскохозяйственным животным, до сих пор мало изучена с позиций геномики и трехмерной организации хроматина изучены по сравнению с модельными организмами,

такими как мышь или человек. Впервые проведен сравнительный анализ укладки хроматина в фибробластах и эритроцитах курицы, что позволило выявить эволюционно-консервативные и специфичные особенности организации генома птиц. Это открывает новые перспективы для понимания эволюции геномной организации у позвоночных. Исследование пяти видов комаров рода *Anopheles* (*An. coluzzii*, *An. merus*, *An. stephensi*, *An. atroparvus* и *An. albimanus*) является уникальным, поскольку полученные данные о контактах хроматина, транскрипционной активности и гистоновых метках являются первыми для этих видов. Впервые обнаружены протяженные эволюционно-консервативные хроматиновые петли, что может иметь важное значение для понимания механизмов регуляции генома у насекомых.

Во-вторых, новизна работы связана с использованием современных методов геномики с авторскими модификациями. В работе применены передовые методы захвата конформации хромосом (Hi-C) и его модификации для различных типов клеток и видов животных. Автор разработал уникальные экспериментальные подходы, включая технологию Exo-C, которая совмещает экзомное обогащение и захват конформации хромосом. Это позволяет одновременно детектировать хромосомные перестройки и однонуклеотидные варианты и является оригинальным подходом, ранее не применявшимся в области медицинской генетики.

Комбинация современных экспериментальных методов с разработанными вычислительными инструментами позволяет получать более полную картину организации генома и его функциональных особенностей. Такой интегративный подход является новаторским и способствует развитию междисциплинарных исследований в биологии.

Оценка достоверности научных результатов обоснованности выводов и научных положений, выносимых на защиту

Важным фактором, обеспечивающим достоверность результатов, является использование автором современных статистических методов при

анализе данных. Применение надежных статистических подходов позволило объективно оценить значимость полученных результатов, уменьшить влияние случайных факторов и обеспечить воспроизводимость выводов. Использование методов машинного обучения и анализа больших данных с соблюдением необходимых процедур валидации и тестирования моделей дополнительно подтверждает надежность и устойчивость полученных данных. Кроме того, полученные данные демонстрируют высокую степень согласованности с результатами исследований на других модельных объектах

Высокий уровень публикационной активности автора также свидетельствует о достоверности результатов исследования. Результаты работы были опубликованы в статьях в высокорейтинговых международных журналах. Публикация в таких журналах предполагает строгий процесс рецензирования, что подтверждает высокое качество и надежность представленных данных.

Выводы и научные положения, представленные в диссертационной работе, обладают высокой степенью обоснованности, что достигается благодаря сочетанию большого объема экспериментальных данных, применению современных методов анализа и тщательной интерпретации результатов. Автор последовательно и логично обосновывает каждое положение, выносимое на защиту, опираясь на полученные данные и сравнивая их с результатами других исследований.

Теоретическая и практическая значимость работы

Диссертационная работа имеет существенную теоретическую и практическую значимость, обусловленную полученными результатами и их вкладом в развитие геномики, эпигенетики и биоинформатики.

Обнаружение эволюционно-консервативных особенностей укладки хроматина, таких как отсутствие CTCF-опосредованных ТАДов в эритроцитах курицы и специфические петлевые взаимодействия в хромосоме X комаров,

способствует развитию теоретических моделей геномной организации и пониманию механизмов эволюции генома. Кроме того, полученные результаты позволяют лучше понять, как трехмерная организация хроматина влияет на регуляцию экспрессии генов, процессы дифференцировки клеток и развитие патологий. Это имеет фундаментальное значение для теоретической биологии и генетики.

Создание нейронной сети DeepCT и других инструментов на основе машинного обучения для предсказания эпигенетических характеристик открывает новые направления в теоретической биоинформатике. Это способствует развитию методов анализа больших данных и моделирования сложных биологических систем.

С практической точки зрения, следует в первую очередь отметить разработанную технологию Exo-C и соответствующие вычислительные инструменты, которые позволяют эффективно выявлять хромосомные перестройки и однонуклеотидные варианты у пациентов с пороками развития и редкими заболеваниями. Это имеет непосредственное практическое значение для улучшения диагностики и разработки индивидуальных подходов к лечению. В то же время возможность предсказания влияния геномных изменений на эпигенетические характеристики клеток способствует более точной интерпретации генетических данных и может использоваться для разработки новых терапевтических стратегий.

Созданные программные продукты предоставляют исследователям эффективные средства для анализа геномных данных, что ускоряет проведение научных исследований и способствует получению новых знаний в области геномики и эпигенетики.

Таким образом, диссертационная работа имеет глубокую теоретическую и практическую значимость. Она расширяет фундаментальные знания о трехмерной организации генома у различных видов, развивает новые методологические подходы и предоставляет инструменты, полезные для научных исследований и практического применения в медицине и

биотехнологии. Использование результатов работы в образовательном процессе способствует подготовке нового поколения ученых и специалистов, способных эффективно решать современные научные и практические задачи.

Содержание и оформление диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, основное содержание, включающее пять подглав, заключение и выводы, благодарности и список использованной литературы.

Введение, цель и задачи исследования. В первом разделе автор обосновывает актуальность выбранной темы и формулирует цель и задачи исследования. Раздел включает следующие подразделы:

- Актуальность исследования: автор подробно описывает значимость изучения трехмерной организации хроматина у животных и ее нарушения при хромосомных перестройках, подчеркивая современные тенденции и пробелы в знаниях.
- Научная новизна: представлены новые результаты, полученные в ходе исследования, их уникальность и вклад в науку.
- Практическая значимость: описаны возможные приложения результатов в медицине, биоинформатике и других областях.
- Методология и методы исследования: автор описывает использованные методы геномики, биоинформатики и экспериментальные подходы, включая собственные модификации.
- Положения, выносимые на защиту: перечислены основные научные результаты и выводы, полученные в работе.
- Апробация работы: указаны конференции и научные мероприятия, где были представлены результаты исследования.
- Степень достоверности полученных результатов: обоснована надежность и проверяемость данных.

- Публикации по теме научного доклада: приведен список научных статей и публикаций автора по теме диссертации.
- Личный вклад автора: подчеркнута непосредственная роль автора в проведении исследований и получении результатов.

Раздел написан грамотным и научно обоснованным языком. Информация представлена последовательно и логично, что способствует ясному пониманию целей и задач исследования. Подразделы хорошо структурированы и взаимосвязаны.

2. Основное содержание доклада

Основная часть диссертации включает пять подглав, в которых изложены результаты работы.

2.1. Сравнительный анализ укладки хроматина в разных типах клеток и у разных видов позвоночных животных. В этой подглаве автор проводит сравнительный анализ организации хроматина в фибробластах и эритроцитах курицы (*Gallus gallus*). Описаны методики получения и анализа данных Hi-C, представлены результаты сравнения укладки хроматина у птиц и млекопитающих. Автор выявляет эволюционно-консервативные и специфические особенности трехмерной организации генома.

2.2. Сравнительный анализ укладки хроматина у комаров рода *Anopheles*. Автор исследует трехмерную организацию хроматина у пяти видов комаров рода *Anopheles*: *An. coluzzii*, *An. merus*, *An. stephensi*, *An. atroparvus* и *An. albimanus*. В подглаве подробно описаны результаты по сборке геномов и анализу контактов хроматина у этих видов. Выявлены характерные петлевые взаимодействия в хромосоме X и обсуждается их эволюционное значение.

2.3. Разработка биоинформационных методов для предсказания трехмерной архитектуры хроматина и эпигенетических характеристик хроматина в клетках млекопитающих. В этой части диссертации автор описывает разработку нейронной сети DeepCT и других биоинформационных инструментов. Представлены методики обучения моделей на больших наборах данных, результаты предсказаний эпигенетических характеристик и

их валидация. Обсуждается значимость разработанных методов для понимания регуляции генома и интерпретации геномных вариантов.

2.4. Использование технологий захвата конформации хромосом для поиска хромосомных перестроек у человека. Раздел разделен на два подраздела. В подразделе “Разработка технологии Exo-C” автор представляет новую экспериментально-компьютерную методику Exo-C, объединяющую экзомное обогащение и захват конформации хромосом. Описаны этапы разработки, оптимизация протокола и преимущества метода. В подразделе “Применение технологии Exo-C для идентификации и характеристики хромосомных перестроек у пациентов” представлены результаты применения технологии Exo-C для выявления хромосомных перестроек у пациентов с пороками развития. Автор демонстрирует эффективность метода на реальных клинических образцах, обсуждает полученные данные и их клиническое значение.

2.5. Применение методов геномики и биоинформатики для решения задач в области генетики развития и медицинской генетики. В заключительной подглаве основной части автор обобщает применение разработанных методов и инструментов для решения практических задач. Описаны случаи успешного использования методов геномики и биоинформатики в диагностике и исследовании генетических заболеваний, подчеркнута перспективность подходов для медицинской генетики.

3. Заключение и выводы

В разделе автор подводит итоги проведенного исследования, обобщает основные результаты и формулирует выводы. Подчеркнута значимость полученных данных для развития фундаментальной науки и практического применения в медицине и биотехнологиях.

Содержание и оформление диссертации свидетельствуют о высоком уровне выполненной работы. Автору удалось подробно и понятно изложить сложный научный материал, структурировать информацию и представить результаты в доступной форме. Это делает диссертацию ценным научным трудом,

интересным для специалистов в области геномики, эпигенетики и биоинформатики.

Замечания

Сколько-нибудь значимых, как и незначимых, замечаний к диссертационной работе В.С. Фишмана в форме научного доклада у меня нет. Все четко, ясно, предельно корректно как в своей научной сути, так и в описании личного вклада и в благодарностях своим партнерам и соавторам. Возможно, к замечаниям можно было бы отнести некоторый редакционные огрехи, возникшие, вероятно, в результате обратного перевода ряда положений высококлассных статей автора, но и они совершенно точно относятся лишь к личным вкусовым предпочтениям оппонента.

В целом диссертационная работа В.С. Фишмана, от постановки целей и определения задач исследования, описания биологически интереснейших объектов, до выводов, в т.ч. список великолепных публикаций по теме, оставили у меня почти забытое чувство «глубокого удовлетворения». Следует поздравить научного консультанта диссертанта, профессора Серова Олега Леонидовича, коллег по работе и публикациям, и весь коллектив отдела молекулярных механизмов онтогенеза ИЦиГ СО РАН с этой, эстетически практически безупречной, диссертационной работой.

Заключение

Диссертационная работа Фишмана Вениамина Семеновича "Трехмерная организация хроматина у животных и ее нарушения при хромосомных перестройках", представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.22 - клеточная биология, 1.5.8. -

математическая биология, биоинформатика, является завершенной научно-исследовательской работой, выполненной на высоком современном техническом уровне. Поставленная цель и задачи соответствуют выполненной работе, использованные подходы и тематика исследования соответствуют паспортам специальностей 1.5.22. клеточная биология и 1.5.8. математическая биология, а полученные выводы полностью отражают полученные результаты и не вызывают сомнений. Представленная работа соответствует всем требованиям пп. 9-14 "Положения о присуждении ученых степеней", утвержденному постановлением Правительством РФ от 24.09.2013 №842 (в редакции № 62 от 25.01.2024), а ее автор - Вениамин Семенович Фишман - заслуживает присуждения ему ученой степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.22. клеточная биология и 1.5.8. математическая биология, биоинформатика.

Официальный оппонент,
Графодатский Александр Сергеевич,



16.10.2024

доктор биологических наук по специальности 03.02.07 - генетика, член-корреспондент РАН, профессор, заведующий Отделом разнообразия и эволюции геномов, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН)

Адрес: пр. Академика Лаврентьева, 8/2, Новосибирск, Новосибирская обл., 630090

Телефон: 8 (383) 363-90-42

E-mail: graf@mcb.nsc.ru

Подпись оппонента удостоверяю
Ученый секретарь ИМКБ СО РАН,
канд.биол. наук
16.10.2024



Ахмерова Л.С.