

## **ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА**

на диссертацию в форме научного доклада Фишмана Вениамина Семеновича «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.

### **1. Актуальность темы**

Заметный прогресс, наблюдаемый в последние годы, в расшифровке геномов различных биологических видов дает существенное, но в то же время пока ограниченное представление о закономерностях организации и реализации наследственной информации в фило- и онтогенезе. Действительно, начинает активно накапливаться информация, что структура хроматина и его укладка в пространстве клеточного ядра играет существенную, и возможно еще не в полной степени оцененную роль в регуляции молекулярно-генетических процессов. Происходит пересмотр традиционных представлений о механизмах компактизации ДНК и организации клеточного ядра, подкрепляемый достижениями в области криофотонной и конфокальной микроскопии. Накапливается всё больше доказательств того, что контакты хроматина напрямую влияют на экспрессию генов. Пространственное расположение регуляторных участков ДНК, таких как энхансеры и промоторы, обуславливает их взаимодействие в пределах определенных доменов хроматина и, соответственно, уровень транскрипционной активности. Данные экспериментальных исследований свидетельствуют, что нарушения пространственных взаимодействий, особенно вследствие хромосомных перестроек, могут приводить к серьезным патологиям, включая наследственные и онкологические заболевания, а также

врожденные пороки развития. Именно поэтому исследования в данном направлении представляются особенно актуальными в современной медицинской генетике, обеспечивая новые возможности для улучшения молекулярной диагностики наследственных болезней, а также для понимания тонких механизмов их патогенеза.

Большинство исследований трёхмерной организации генома на сегодняшний день сосредоточено на таких модельных организмах, как мышь и дрозофилы. Вне этих модельных систем информация остается достаточно ограниченной, в том числе и для человека. Диссертационная работа В.С. Фишмана восполняет этот пробел, исследуя укладку хроматина у птиц и комаров рода *Anopheles*, и ставит новые вопросы эволюционной консервативности и видовой специфичности трехмерной организации генома в различных таксономических группах.

Наконец, одним из ключевых вызовов современной геномики является огромный массив информации, который генерируется с помощью высокопроизводительных методов секвенирования ДНК, в частности таких как технологии Hi-C (захват конформации хромосом). Эти данные требуют разработки эффективных методов биоинформационного анализа, которые позволяют не только визуализировать структуру хроматина, но и выявлять в ней функциональные, патогенетически значимые изменения. В этой связи, актуальность темы диссертации Вениамина Семеновича Фишмана не вызывает сомнений.

## **2. Научная новизна и объем исследования**

Научная новизна работы Вениамина Семеновича Фишмана определяется постановкой и решением вопроса об эволюционной консервативности и видовой специфичности трехмерной архитектуры генома у представителей далеких таксономических групп. В диссертационном исследовании впервые

представлены экспериментальные данные об особенностях трехмерной организации хроматина у таких биологических видов, как домашняя курица (*Gallus gallus*) и комары рода *Anopheles*. В частности, впервые проведён сравнительный анализ трёхмерных контактов хроматина в клетках птиц и млекопитающих, а также у пяти видов комаров рода *Anopheles*, что существенно дополняет формируемые представления об эволюции и изменчивости пространственной организации хроматина. Установлено, что ядра эритроцитов курицы характеризуются отсутствием типичных для большинства изученных видов CTCF-опосредованных топологически ассоциированных доменов и наличием усиленной компартментализации генома. В то же время в геномах комаров впервые описаны протяженные петлевые домены хроматина между локусами X-хромосомы, расположенными на расстоянии до нескольких миллионов пар оснований друг от друга.

Новизна исследования заключается и в описании редких геномных вариантов у людей с наследственными заболеваниями. Использование уникальной коллекции пациентов из российских медико-генетических центров добавляет оригинальности и практической значимости выполненному исследованию. Значимым является и применение современных методов геномики, таких как Hi-C, и его авторские модификации, в частности метод Exo-C, которые позволили детально, на высоком уровне разрешения не только исследовать трехмерную архитектуру хроматина, но и детектировать одновременно и однонуклеотидные варианты, и микроструктурные хромосомные изменения. Дополнительно следует отметить использование методов машинного обучения и биоинформационного анализа больших данных. Применение таких подходов начинает развиваться, и данная диссертация демонстрирует, как эти методы

могут не только существенно изменить подходы к изучению организации генома, но и способствовать совершенствованию технологий диагностики наследственных и врожденных заболеваний.

Объём экспериментальной работы заслуживает самой высокой оценки: проведено секвенирование нескольких сотен геномных библиотек и проанализировано более тысячи публичных наборов данных, что подтверждается большим количеством публикаций в высокорейтинговых журналах. Это подчеркивает масштаб и глубину проведённого исследования.

### **3. Оценка достоверности научных результатов**

Автором тщательно проанализированы известные достижения и теоретические положения в исследуемой предметной области, в том числе работы по сравнительному анализу укладки хроматина у разных видов животных и исследования, направленные на разработку методов детекции хромосомных перестроек. Это позволило выбрать оптимальные подходы для решения каждой из поставленных задач. Результаты, полученные в ходе работы, имеют высокий уровень достоверности. Применение современных статистических методов анализа данных также является ключевым фактором, подтверждающим достоверность результатов. Разработанные в ходе исследования оригинальные методы позволяют с высоким уровнем разрешения оценивать частоты контактов хроматина и геномные взаимодействия, обеспечивая высокую точность и надёжность выводов.

Для обеспечения точности и воспроизводимости результатов в каждом эксперименте были предусмотрены контрольные группы. Кроме того, в эксперименты включены биологические и технические повторности, которые позволяли исключить возможность случайных ошибок и обеспечить статистическую значимость данных. Высокий уровень публикаций автора в международных журналах категории Q1 и Q2 также свидетельствует о

достоверности научных результатов, прошедших рецензирование ведущих специалистов в области структурной и функциональной геномики.

#### **4. Степень обоснованности выводов и научных положений, выносимых на защиту**

Выводы и научные положения, выносимые на защиту, логично вытекают из результатов проведенных исследований, они объективны, полностью обоснованы и не вызывают сомнений. Достоверность как выводов, так и научных положений, выносимых на защиту, подтверждается большим количеством экспериментального материала и тщательностью проведенного анализа, результаты которого согласуются между собой. Исследования проведены с использованием современных методов, в том числе и разработанных автором лично, включая метод Exo-C и пакеты биоинформационных программ для обработки данных о трехмерной организации генома.

#### **5. Теоретическая и практическая значимость работы**

Исследование трёхмерной организации хроматина и её нарушений при хромосомных перестройках имеет как фундаментальное значение для расшифровки патогенетических механизмов формирования наследственной патологии, так и важное прикладное значение для медицинской генетики и биоинформатики. Результаты работы позволяют глубже понять механизмы регуляции генов и их связь с пространственной укладкой ДНК в ядре клетки, что открывает новые возможности для разработки прежде всего диагностических подходов, а в перспективе и генотерапевтических решений.

В работе впервые продемонстрированы эволюционно-консервативные принципы укладки хроматина в клетках птиц и млекопитающих, а также получены уникальные данные по трёхмерной структуре хроматина у таких организмов, как комары рода *Anopheles*. Эти исследования расширяют наши

представления о механизмах формирования топологически ассоциированных доменов (ТАДов) и хромосомных компартментов в геномах разных организмов. Заслуживают особого внимания данные, указывающие на возможную роль границ ТАДов в детерминации регионов возникновения хромосомных перестроек. Фундаментальные знания о пространственной организации генома важны для понимания эволюционных процессов, биологии развития и клеточной дифференцировки.

Методы машинного обучения, использованные в работе, позволили предсказывать эпигенетические характеристики клеток и тем самым оценивать функциональные характеристики геномных вариантов. Это открывает возможности для автоматизации процесса анализа геномных данных, что может быть использовано в персонализированной медицине для определения индивидуальных рисков развития заболеваний. Существенную ценность разработанные биоинформационные инструменты могут представлять для интерпретации патогенетической значимости генных и хромосомных вариантов, выявляемых в ходе молекулярной диагностики наследственных заболеваний.

Разработанная технология Exo-C, которая сочетает экзомное секвенирование и метод Hi-C, позволяет одновременно обнаруживать хромосомные перестройки и однонуклеотидные варианты. Данная технология представляет очевидный научно-практический интерес для медицинской генетики, обеспечивая диагностику криптических, в том числе сбалансированных хромосомных перестроек, затрагивающих регуляторные последовательности генома.

Результаты исследования несомненно могут стать основой для новых образовательных курсов по геномике, эпигенетике, клеточной биологии и

биоинформатике, обеспечивая введение в передовые методы анализа трёхмерной организации генома и их применение в биомедицине.

## **6. Содержание и оформление диссертации**

Диссертация изложена на 77 страницах и содержит следующие разделы: введение, основное содержание (разделено на 5 подглав), заключение и выводы.

1. Введение. Введение включает следующие подразделы: актуальность исследования, научная новизна, практическая значимость, методология и методы исследования, положения, выносимые на защиту, апробация работы, степень достоверности полученных результатов, публикации по теме научного доклада, и личный вклад автора. В данном разделе представлены цели и задачи исследования, обоснована актуальность темы и её значимость для научного сообщества. Автор кратко и ёмко излагает суть проблемы, обосновывает необходимость использования современных методов, таких как Hi-C и машинное обучение. Введение логично структурировано и ориентирует читателя на основные направления работы.

2. Основное содержание. Основное содержание работы разбито на пять подглав, каждая из которых раскрывает разные аспекты исследования трёхмерной организации хроматина и её нарушений при хромосомных перестройках.

2.1. Сравнительный анализ укладки хроматина в разных типах клеток и у разных видов позвоночных животных. В этой подглаве изложены результаты сравнительного анализа структуры хроматина у птиц и млекопитающих. Особое внимание уделено эволюционной консервативности ТАДов и их роли в регуляции генов. Текст хорошо структурирован, с последовательным изложением данных и их анализом. Подглава сопровождается подробными схемами и графиками, которые наглядно

илюстрируют результаты экспериментов, что способствует лучшему восприятию материала.

2.2. Сравнительный анализ укладки хроматина у комаров рода *Anopheles*. Данный подраздел посвящен изучению трёхмерной структуры хроматина у комаров рода *Anopheles*. Автор описывает специфические особенности компартментов и ТАДов у этих насекомых, выделяет эволюционно-консервативные контакты хроматина. Текст написан лаконично и с ясной логической структурой. Положительным моментом является сравнение собственных результатов с данными, полученными на ранее изученных организмах, что усиливает научную ценность работы. Подглава дополнена графиками, что делает изложение более наглядным и доступным для восприятия.

2.3. Разработка биоинформационных методов для предсказания трёхмерной архитектуры хроматина и эпигенетических характеристик хроматина в клетках млекопитающих. В данном разделе представлено описание разработки новых биоинформационных инструментов для анализа трёхмерной структуры хроматина и предсказания эпигенетических характеристик на основе анализа последовательности ДНК. Автор подробно рассматривает алгоритмы, использованные в нейронной сети DeepCT, и демонстрирует их применение в геномике человека. Раздел иллюстрирован примерами работы этих инструментов на реальных данных, что наглядно демонстрирует их практическую значимость.

2.4. Использование технологий захвата конформации хромосом для поиска хромосомных перестроек у человека. В этом разделе изложено использование метода Exo-C для идентификации и характеристики хромосомных перестроек. Описаны экспериментальные протоколы, а также результаты анализа ряда клинических образцов, что делает данный раздел

особенно важным с точки зрения прикладных аспектов работы. Автор акцентирует внимание на преимуществе технологии ЕхоС в сравнении с классическими методами, в том числе в возможности одновременной детекции как генных, так и микроструктурных хромосомных вариантов.

2.5. Применение методов геномики и биоинформатики для решения задач в области генетики развития и медицинской генетики. Эта подглава охватывает применение результатов исследования для решения практических задач в биоинформатике и медицинской генетике.

3. Заключение и выводы. Заключение подводит итоги работы, где автор акцентирует внимание на ключевых результатах исследования и их значимости для науки и практики. Изложение чёткое, структурированное, с акцентом на значимые достижения, такие как разработка метода ЕхоС и применение машинного обучения для предсказания укладки хроматина. Заключение интегрирует теоретические и прикладные аспекты работы, показывая их взаимосвязь. Выводы изложены лаконично, подчеркивая основное содержание работы и её значение для будущих исследований.

#### Общее оформление

Диссертация написана грамотным и научно обоснованным языком, текст изложен логично и последовательно. Работа сопровождается большим количеством иллюстраций, таких как графики и схемы, что способствует лучшему пониманию экспериментальных данных. Оформление выдержано в соответствии с академическими стандартами, с соблюдением всех необходимых правил, что делает работу доступной для чтения и восприятия.

#### 7. Замечания, вопросы

Принципиальных замечаний по содержанию диссертационной работы не возникает. В качестве дискуссии хотелось бы услышать мнение автора о существующих ограничениях разработанного в диссертации нового метода

Exo-C, если таковые имеются, в контексте перспектив его внедрения в клиническую диагностическую практику.

## **8. 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 методическом уровне. Получены новые, приоритетные результаты в области клеточной и молекулярной биологии, достоверность которых не вызывает сомнений. Результаты выполненной работы расширяют представления о фундаментальных молекулярно-биологических механизмах, лежащих в основе трехмерной организации наследственной информации в клетке, а также создают основу для совершенствования алгоритмов молекулярно-генетической диагностики наследственных заболеваний. Проведенное исследование соответствует паспортам специальностей 1.5.22 – клеточная биология и 1.5.8 – математическая биология, биоинформатика, а полученные выводы полностью отражают полученные результаты и не вызывают сомнений. Представленные в диссертации результаты опубликованы в рецензируемых профильных журналах, многие из которых относятся к наиболее престижным изданиями в соответствующей области.

Таким образом, представленная работа по своей актуальности, научной значимости и новизне полученных результатов соответствует всем требованиям пп. 9-14 “Положения о присуждении ученых степеней”, утвержденному постановлением Правительства 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.

Директор  
Федерального государственного  
бюджетного научного учреждения  
«Томский национальный исследовательский  
медицинский центр Российской академии наук»  
(Томский НИМЦ),  
главный научный сотрудник  
лаборатории эволюционной генетики  
Научно-исследовательского института  
медицинской генетики Томского НИМЦ  
академик РАН, д.б.н., профессор

В.А. Степанов

Подпись В.А. Степанова заверяю  
Ученый секретарь Томского НИМЦ  
к.б.н.  — И.Ю. Хитринская

01. 11. 2024 2

## Сведения об официальном оппоненте

Степанов Вадим Анатольевич, академик РАН,

доктор биологических наук (1.5.7 – Генетика), профессор,

директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» (Томский НИМЦ), главный научный сотрудник лаборатории эволюционной генетики Научно-исследовательского института медицинской генетики Томского НИМЦ

634050, г. Томск, ул. Набережная р. Ушайки, д. 10

e-mail: vadim.stepanov@medgenetics.ru

тел: +7-3822-51-22-28