

УТВЕРЖДАЮ

И.о. директора ФГБУН “Институт общей
генетики им. Н.И. Вавилова Российской
академии наук”



А.В. Мисюрин

30 октября 2024 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации о диссертационной работе **Фишмана Вениамина Семеновича** на
тему «**Трехмерная организация хроматина у животных и ее нарушения при
хромосомных перестройках**», представленной на соискание ученой степени доктора
биологических наук в форме научного доклада по специальностям

1.5.22. - клеточная биология

1.5.8. - математическая биология, биоинформатика

Актуальность диссертационной работы

Диссертационная работа Фишмана В.С. представляет новое направление в области геномики, основанное на разработке и использовании экспериментальных методов, вычислительных алгоритмов и программного обеспечения для исследования трехмерной (3D) архитектуры интерфазного ядра клеток человека и животных. В рамках этого направления широко используются методы на основе технологии захвата конформации хромосом, совмещенные с высокопроизводительным секвенированием (Hi-C). Эта недавно возникшая технология предоставляет возможность определять частоты пространственных контактов между парами участков ДНК в полногеномном масштабе. Биоинформационический анализ таких 3D-контактов позволяет выявлять структурные единицы организации хроматина, а также определять взаимосвязь пространственной укладки ДНК и экспрессии генов. Кроме того, набор методов анализа трехмерных контактов хроматина, разработанный в рамках диссертации, позволяет детектировать сбалансированные хромосомные перестройки и другие типы вариантов в геноме человека. Актуальность этого нового направления научных исследований можно обозначить следующими пунктами.

Во-первых, понимание трехмерной структуры генома имеет ключевое значение для расшифровки механизмов регуляции генов. Традиционные методы секвенирования ДНК позволяют выявлять последовательность генома, однако они не дают представления о пространственной организации хроматина, которая играет важную роль в регуляции генетической активности и, следовательно, в функционировании клеток. Технологии, разработанные в рамках данной диссертации, заполняют этот пробел, предоставляя исследователям инструменты для детального изучения пространственных контактов внутри генома.

Во-вторых, использование 3D-геномики открывает новые перспективы в медицинской генетике. Возможность выявления и интерпретации геномных перестроек и других структурных вариантов имеет непосредственное применение в диагностике и лечении наследственных заболеваний и онкологических патологий. Разработанные методы позволяют с высокой точностью идентифицировать хромосомные перестройки, что особенно важно для выявления редких и сложных генетических нарушений.

Новизна исследования и полученных результатов

Исследование охватило ранее не охарактеризованные таксономические группы и специфические клеточные типы, что позволило получить уникальные данные о

пространственной организации хроматина у различных видов животных, включая птиц и комаров рода *Anopheles*. Были разработаны и внедрены новые экспериментальные и вычислительные методы для анализа трехмерной укладки хроматина.

Впервые было показано значительное изменение укладки топологически ассоциированных доменов (ТАДов) в ходе созревания эритроцитов, что дает новое понимание о роли трехмерной структуры хроматина в дифференцировке клеток. Также было выявлено формирование ТАДов и компартментов в соматических клетках птиц, что расширяет наши знания о структурной организации хроматина у различных видов позвоночных. Проведено первое количественное сравнение частот трехмерных контактов хроматина в клетках птиц и млекопитающих, что позволяет дать количественную оценку различий в укладке хроматина у этих видов и имеет важное значение для понимания эволюционных процессов.

Впервые были получены данные о трехмерной укладке хроматина на уровне ТАДов и компартментов для комаров рода *Anopheles*. Обнаружено, что у этих комаров имеются протяженные эволюционно-консервативные хроматиновые петли длиной до 10 миллионов пар оснований, что свидетельствует о высокой степени сохранности этих структур в процессе эволюции.

Предложен новый экспериментальный подход для одновременной полногеномной детекции хромосомных перестроек и однонуклеотидных вариантов в экзоме человека. Эти методы позволяют с высокой чувствительностью выявлять хромосомные перестройки размером более 100 тысяч пар оснований, что является значительным достижением в области медицинской генетики.

Кроме того, разработаны новые вычислительные инструменты для межвидового сравнения данных Hi-C, предсказания контактов хроматина и других эпигенетических характеристик.

Все это вместе взятое убедительно свидетельствует о новизне предложенного соискателем направления для клеточной биологии, математической биологии и биоинформатики.

Значимость для науки и практики полученных результатов

В диссертационной работе В.С. Фишмана были созданы новые вычислительные и экспериментальные методики для сбора и всестороннего анализа больших объемов данных геномной ДНК, полученных с использованием высокопроизводительного

секвенирования. В числе используемых технологий - Hi-C, RNA-seq и ChIP-seq. Эти методики доказали свою эффективность в решении различных задач в областях молекулярной биологии, эволюционной генетики и медицины. Разработанные биоинформационные методы, алгоритмы и программные средства были признаны научным сообществом и опубликованы в ведущих журналах, что подтверждает высокий уровень выполненных исследований. Представленные в диссертации уникальные экспериментальные и биоинформационные подходы имеют широкий потенциал для дальнейших научных и медицинских исследований.

Программное обеспечение, разработанное в рамках диссертации Фишмана В.С., предоставило новые возможности для получения данных высокопроизводительного секвенирования, позволяющих охарактеризовать структуру хроматина у человека и других видов животных. Эти данные могут быть использованы вместе с независимыми источниками для мета-анализа текущего состояния геномики, а также служить обучающим и контрольным материалом для создания нового программного обеспечения, направленного на решение разнообразных биоинформационных задач.

Дополнительно, в работе Фишмана В.С. представлены новые сведения о трехмерной организации хроматина, включая значительные изменения в укладке топологически ассоциированных доменов (ТАДов) в процессе созревания эритроцитов и формирование ТАДов в соматических клетках птиц. Также были обнаружены эволюционно-консервативные хроматиновые петли у комаров рода *Anopheles*, что позволяет лучше понять процессы эволюционной консервации.

Разработанные В.С. Фишманом методы и алгоритмы дали возможность получить ранее неизвестные научные данные о трехмерной структуре генома, ее роли в регуляции генов и различиях в хроматиновой организации у разных видов. Эти результаты значительно дополняют и расширяют современные биологические представления в данной области науки.

Разработанные алгоритмы сравнения геномных разметок могут послужить основой для вычислительных средств, применимых в клинической практике, что существенно упростит процесс анализа геномных данных и ускорит внедрение новых методов в медицину.

Представляется целесообразным включение материалов диссертации В.С. Фишмана в учебные программы вузов по специальностям 1.5.22. - клеточная биология и 1.5.8 - математическая биология, биоинформатика, а также в программы повышения

квалификации и факультативных курсов на факультетах физики, естественных наук, математики, информационных технологий и медицины.

Обоснованность и достоверность научных положений и заключений

Обоснованность и достоверность научных положений и заключений, представленных в диссертации В.С. Фишмана, подкрепляются применением передовых биоинформационных методов, которые были значительно усовершенствованы. Также учитывается статистическая значимость результатов, данные подтверждаются с использованием контрольных экспериментов и биологических повторов. Сильным аргументом в пользу исследования является также корректное сопоставление с данными, полученными другими учеными.

Вклад Фишмана В.С. в данной диссертационной работе является определяющим, что подтверждается и тем, что он является либо первым автором, либо автором для переписки по большинству публикаций. Это подчеркивает его центральную роль в проведении исследований в областях клеточной биологии и биоинформатики.

По материалам диссертации опубликовано более 50 статей в престижных научных журналах, индексируемых в международных и российских реферативных системах. Такой объем, и качество публикаций говорят о значительном вкладе Фишмана В.С. в развитие указанных научных дисциплин. Все это вместе взятое свидетельствует об решающем личном вкладе Фишмана В.С. в его диссертационную работу по специальностям 1.5.22. - клеточная биология и 1.5.8 - математическая биология, биоинформатика.

Оценка содержания диссертационной работы и ее завершенности

Автореферат диссертации Фишмана В.С., представляемой в форме научного доклада, представляет собой структурированный текст, включающий 75 страниц машинописного текста, организованного по классическому академическому плану. Работа начинается с введения на 18 страницах, где автор подробно излагает актуальность выбранной темы, цели и задачи исследования, а также методологию и методы, использованные в исследовании. Введение также включает обзор научной новизны и практической значимости работы, положения, выносимые на защиту, информацию об апробации работы и степени достоверности полученных результатов. В разделе об актуальности исследования подчеркивается вклад работы в развитие современной геномики и биоинформатики. Раздел завершается на странице 19, где подробно описывается личный вклад автора в исследование.

Основное содержание доклада начинается со страницы 20 и включает детальный сравнительный анализ укладки хроматина в различных типах клеток и у разных видов позвоночных животных, а также у комаров рода *Anopheles*. Далее, на странице 39, В.С. Фишман обсуждает разработку биоинформационных методов для предсказания трехмерной архитектуры хроматина и его эпигенетических характеристик в клетках млекопитающих. Раздел о технологиях захвата конформации хромосом для поиска хромосомных перестроек у человека начинается с страницы 54 и включает разработку технологии Exo-C, а также её применение для идентификации и характеристики хромосомных перестроек у пациентов.

В последнем разделе основного содержания, начиная с страницы 66, обсуждается применение методов геномики и биоинформатики в решении задач генетики развития и медицинской генетики. Заключение и выводы на странице 67 подводят итоги исследования, подчеркивая значимость и результаты работы.

Дополнительные благодарности и список использованной литературы размещены на странице 72, завершая структуру диссертации. Библиографический список содержит 47 источников.

Весь текст отличается лаконичностью, логичностью и ясностью изложения, что облегчает его понимание. Текст хорошо иллюстрирован, содержит 17 рисунков, большинство из которых состоит из нескольких панелей.

Замечания по содержанию диссертации

Текст доклада В.С. Фишмана хорошо подготовлен и легко читается, иллюстрации понятны и хорошо объяснены. Тем не менее местами встречаются досадные недоработки. По части содержательной критики наибольшие вопросы вызывает описание "клеточных состояний". Автор утверждает, что комплекс разметок генома (доступность хроматина, гистоновые метки, профили связывания ДНК-связывающих белков и т.д.) характеризует "эпигенетическую историю" клетки. Это утверждение - не более чем переформулировка того, что все упомянутые характеристики формируются в процессе онтогенетической дифференцировки. С содержательной точки зрения использованный набор эпигенетических профилей не содержит историю формирования клеточного типа, поскольку при обучении нейронной сети отсутствует информация о стадии формирования клеточных типов в процессе дифференцировки. По сути речь идет о кодировании конкретных клеточных типов набором эпигенетических состояний. Вообще, текст,

описывающий обучение нейронной сети DeepST при всей популярности сложен для понимания. Нет понятного описания каким образом происходило обучение нейронной сети, и в чем заключались данные. В тексте сказано "На следующем этапе векторные представления последовательности ДНК и состояния клетки объединяются и передаются в финальную часть нейросети, которая обрабатывает их и выдает предсказания о наличии каждой эпигенетической метки". При этом "состояние клетки" само представляет собой набор эпигенетических меток, пусть подвергнутых кластеризации. В оправдание автору можно сказать, что, возможно, такое описание сложной системы возможно и невыполнимо для диссертации в форме доклада. Кстати, подпись у рис. 9 обрезана по правому краю.

Раздел про укладку хроматина у *Anopheles* неожиданно изложен хуже других разделов. Конфигурация Рабля предполагает кластеризацию центромеров на одном полюсе ядра, а теломеров - на другом полюсе (как это и показано на рис. 5Д). При этом в тексте (страница 36) очень неудачно сказано про "сближение центромерных и теломерных участков разных хромосом друг с другом", что, очевидно, подразумевает, что теломерные участки сближаются с центромерными. Путаница продолжается на рис. 5А, где синими кругами показаны, согласно подписи, "центромер-теломерные контакты". При этом синими кругами на рисунке обведены как раз области контактов теломера-теломера и центромер-центромер, то есть участки, где контактов много, а желтыми кругами, которые, согласно подписи показывают контакты теломера-теломера вообще оказаны всевозможные контакты для X хромосомы, которая у комара короткая и как раз не укладывается в конфигурацию Рабля. Правильному контакту теломеры с теломерой соответствует единственный из всех желтый круг при контакте теломер хромосом 3L - (2R, 3R).

Подобные недостатки по-видимому неизбежны при подготовке текста такого объема и не снижают общего впечатления от этой замечательной работы.

Заключение

Диссертационная работа Фишмана Вениамина Семеновича на тему «Трехмерная организация хроматина у животных и ее нарушения при хромосомных перестройках» представляет законченное научное исследование, выполненное соискателем на высоком методическом уровне, который обеспечил как создание оригинальных экспериментальных подходов и программного обеспечения, так и получение с их помощью новых научных

результатов в области геномики животных. Автор обобщил эти результаты в контексте сравнения с независимыми литературными данными. Обоснованность выводов и положений, вынесенных на защиту не вызывает сомнений. С точки зрения актуальности, научной новизны, теоретической и практической значимости рассматриваемая докторская работа Фишмана В.С. отвечает всем требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальностям 1.5.22. - клеточная биология и 1.5.8 – математическая биология, биоинформатика.

Диссертация заслушана на семинаре Лаборатории системной биологии и вычислительной генетики ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук 30.10.2024 года (Протокол №1, присутствовало 9 человек из разных организаций, в первую очередь ИОГен РАН и МФТИ).

Заведующий лабораторией системной биологии
и вычислительной генетики ФГБУН Институт
общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской
академии наук, д. ф.-м. наук, член-
корреспондент РАН

В.Ю. Макеев



Ученый секретарь ФГБУН “Институт общей
генетики им. Н.И. Вавилова Российской
академии наук”, д.б.н.

И.И. Горячева

