

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу Кабировой Эвелины Максимовны
«ВЛИЯНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА
НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В ЛОКУСЕ *Kit* МЫШИ»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических
наук по специальности: 1.5.7. — Генетика (биологические науки)

Актуальность темы выполненной работы

За последнее десятилетие благодаря разработке новых геномных технологий, в частности анализа пространственной укладки хромосом в клетках млекопитающих с использованием метода Hi-C, наше понимание третичной организации генома претерпело существенное изменение. Так было показано, что ключевую роль в укладке хроматина в ядре клетки играют топологически ассоциированные домены (ТАДы), представляющие собой петли хроматина различной длины. Также показано, что граница ТАДов формируются при взаимодействии белка когезина с белком CTCF, который связывается с последовательностью CCCTC. Актуальность изучения пространственной организации генома вытекает из роли упаковки ДНК в работе генов. Изменение третичной структуры, в частности нарушение границы ТАДов может приводить к изменению взаимодействия промотора гена с энхансером принципиально изменяя (или полностью выключая) активность экспрессии гена. Варианты генома, изменяющие границу ТАДов могут быть связаны с нарушением дифференцировки тканей и с тяжелыми патологиями. Необходимо отметить, что предполагается, что последствия нарушения границ ТАДов могут иметь тканеспецифические особенности, однако данный вопрос является малоизученным.

Исследованию тканеспецифичной особенности роли ТАДов в регуляции экспрессии генов и посвящено исследование Кабировой Эвелины Максимовны.

Для выполнения исследования был выбран локус *Kit* генома мыши. Выбор данного локуса логично обоснован во введении. В частности, указано, что данный локус характеризуется наличием трех смежных ТАДов, в каждом из которых локализован отдельный ген (*Pdgfra*, *Kit* или *Kdr*) с контрастной экспрессией в отношении других генов локуса.

Сразу хочется отметить логичное построение работы и впечатляюще понятное, четкое и грамотное изложение материала, и отдельно язык, которым работа представлена. Автор явно имеет и литературные дарования, достаточно

ознакомиться с диссертационным исследованием, в частности, с главой Благодарности.

Содержание диссертации

Диссертационная работа Кабировой Э.М. изложена 110 страницах машинописного текста. Работа построена традиционным образом и состоит из введения, содержащего цель и задачи исследования, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения и выводов. Список цитируемой литературы включает 332 источника. Работа иллюстрирована 25 рисунками и 6 таблицами.

Автореферат и публикации достаточно полно отражают содержание и основные положения представленной работы.

Обзор литературы составлен логично и написан прекрасным научным языком и дает достаточно полное представление о механизмах активации промоторов генов их энхансерами, а также анализ современных методом обнаружения энхансеров и промотором в геномах с использованием подходов профилирования гистоновых меток. Подробно описана эволюция анализа конформации хромосом методом Hi-C начиная с работ 2009 года, обсуждаются факторы, влияющие на разрешение метода. Фрагмент обзора литературы, посвященный иерархии образования организации хроматина в клетке заслуживает отдельного внимания и издания его в форме учебного пособия. Обсуждается как роль ТАДов в упаковке хроматина, так и роль фазовой сепарации. В заключении обзора литературы приводятся данные по исследованию локуса Kit мыши и роль генов данного локуса в развитии животных.

В главе материалы и методы подробно описаны как линии мышей инбредных линий, так и линии мутантных мышей, полученных в рамках данного исследования с подробным изложением метода их получения. Исследование изобилует самыми современными методами молекулярно-генетического анализа, включая геномное редактирование, получение линий мутантных животных с делецией границ ТАДов с использованием технологии CRISPR/CAS9.

Также в исследовании использованы методы иммунопреципитации хроматина (ChIP-seq), который был использован для выявления модификаций хроматина, H3K27ac, метки активных энхансеров, а также метод Hi-C и РНК-секвенирования.

В работе получены важные результаты. Исследование можно разделить на две части. На первом этапе были описаны особенности пространственной организации локуса Kit трех типах ткани (эмбриональных фибробластах, тучных клетках, и меланоцитах) у мышей дикого типа, и

полученные данные были сопоставлены с распределением метки активных энхансеров. Карты Hi-C для первичных культур тучных клеток и меланоцитов мыши получены впервые. По этой части исследования были подтверждены выводы о том, что каждый ген находится в отдельном ТАДе о тканеспецифичной регуляции экспрессии генов данного локуса, характеризующемся тканеспецифичностью расположения меток энхансеров. Показано, что уровень экспрессии *Kit* характеризуется тканеспецифичными особенностями организацией хроматина внутри ТАДа.

На втором этапе автором были получены линии мутантных животных с делецией сайтов связывания белка CTCF и оценено влияние нарушения границ ТАДов на экспрессию генов локуса *Kit* с использованием метода РНК-секвенирования в тучных клетках и меланоцитах. Было подтверждено слияние ТАДов методом Hi-C, и, что и является основным выводом работы, последствия в отношении экспрессии генов были различны. Так, например, при слиянии ТАДов, включающих гены *Kit* и *Kdr* не вызывала активацию гена *Kdr* в тучных клетках и приводила к более чем 6 кратному увеличению экспрессии гена *Kdr* в меланоцитах. Причем данный ген был единственный, показавший изменение экспрессии в этой ткани.

Хочется отметить тщательность и аккуратность в оформлении работы, хороший язык и вдумчивость обсуждения. В частности, автор обсуждает использованные методологические подходы, в частности проведение Hi-C тканей животного и их первичными культурами. Также, автор приводит анализ полученных данных о тканеспецифичном ответе в уровне экспрессии гена *Kdr* у мутантных мышей линии *Kit* Δ30k (активация экспрессии произошла в меланоцитах, но не в тучных клетках). Так, обсуждается, что *Kit* в тучных клетках экспрессируется на более высоком уровне (в 10 раз больше) и этот фактор мог быть фактором поддержания инсуляции между активным энхансером гена *Kit* и геном *Kdr*. Автор также обсуждает и ограничение исследования, в частности, тот факт, что положения энхансеров были определены лишь по анализу распределения одной эпигенетической метки H3K27ac.

Автореферат отражает основные результаты, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования.

Научная новизна и теоретическая значимость работы.

Новизна исследования Эвелины Максимовны заключается сразу в нескольких аспектах и не вызывает сомнения. Впервые был охарактеризован локус *Kit* мыши в эмбриональных фибробластах, тучных клетках, и меланоцитах мыши, а также исследован вопрос как нарушение границы ТАДов влияет на экспрессию генов на примере локуса *Kit* мыши в разных

тканях. Исследование проведено в трех типах ткани, а именно эмбриональных фибробластах, тучных клетках, и меланоцитах мышей. Для каждой ткани получены карты Hi-C как в норме, так и при делеции границ ТАДов. Показано, что сам уровень экспрессии гена в ТАДе может быть дополнительным фактором инсуляции внутри ТАДа.

Показали, что эффект нарушения границы между ТАДами Kit и Kdr оказался тканеспецифичным. И что данный эффект может определяться контекстом, включая положение активно транскрибируемого гена относительно энхансера.

Практическая значимость исследования.

Полученные данные в первую очередь представляют большое значение для фундаментального понимания работы генома в целом, что в последствии может лечь в основу интерпретации полученных данных при анализе генома человека при различных патологиях.

Обоснованность и достоверность результатов исследования.

Диссертационное исследование Кабировой Э.М. выполнено на высоком научно-методическом уровне с использованием современных методов исследования. Полученные выводы не вызывают сомнения, в исследование включено достаточное количество модельных линий. Были получены четыре линии мышей: Kit Δ 30k, Kit Δ 30k+, Pdgfra Δ 2k, Pdgfra Δ 60k. Далее получали первичные культуры клеток, а именно, эмбриональные фибробласты мыши (ЭФМ), меланоциты и тучные клетки. Их чистоту подтверждали методами проточной цитометрии, и РНК-секвенирования: экспрессия маркера Pdgfra (ЭФМ), Kit (меланоциты), Kit и FcεRIα (тучные клетки).

Личный вклад автора

Автор диссертационной работы участвовала в разработке всех этапов диссертационной работы, в формулировании целей и задач, анализе и обсуждении экспериментальных данных. Автор самостоятельно проводила молекулярные и клеточные эксперименты (генотипировала мышей для получения линий, получала и культивировала первичные культуры эмбриональных фибробластов и меланоцитов мышей, проводила подготовку образцов и сборку библиотек для секвенирования: RNA-seq, ChIP-seq, cHi-C).

Сведения о полноте опубликованных научных результатов

По результатам исследования опубликовано три статьи с импакт фактором от 5 до 16, и автор диссертационного исследования является первым

автором в двух публикациях, что само по себе говорит о квалификации автора диссертационного исследования и уровне выполненной работы.

Замечания и вопросы

Замечаний к данному представлению работы не имею. В качестве дискуссии хотелось бы уточнить:

- 1) Принимая во внимание, что экспрессия генов интереса оценивалась РНК-секвенированием, а не таргетно, методом ПЦР в режиме реального времени, из каких соображений не был проведен анализ, как делеция сайтов связывания белка CTCF влияет на транскриптом полученных клеточных культур в целом?
- 2) Также хотелось бы услышать мнение автора какими другими методами можно было бы подтвердить данные о локализации энхансеров, полученные в работе по распределению метки H3K27ac.

В заключение хочется отметить, что выполненная работа имеет важное фундаментальное и прикладное значение. И еще раз отметить аккуратное и грамотное изложение полученных результатов и отличное оформление работы.

Заключение

Диссертационная работа Кабириной Эвелины Максимовны **«ВЛИЯНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ХРОМАТИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ В ЛОКУСЕ *KIT* МЫШИ»**, представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.7. — Генетика (биологические науки), является самостоятельной, законченной научно-квалификационной работой, выполненной под руководством кандидата биологических наук Н.Р. Баттулина. В работе, на основании проведенных исследований, сформулированы и обоснованы научные положения, которые могут быть квалифицированы, как решение актуальной научно-практической задачи, направленной на исследование влияния пространственной организации генома на регуляцию экспрессии генов. Впервые получены подтверждения о тканеспецифичном влиянии нарушений границ топологически ассоциированных доменов на уровень экспрессии генов на примере локуса *Kit* мыши. Полученные данные представляют большое значение для интерпретации геномных данных при патологиях человека в последующих исследованиях.

Диссертационная работа содержит достаточное количество наблюдений, имеет необходимые пояснения, подробное обсуждение

полученных результатов. Основные этапы работы, выводы и результаты представлены в автореферате. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации.

Представленная диссертационная работа Кабировой Э.М. соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук.

25.09.2025

официальный оппонент,
доктор биологических наук,
заведующий лабораторией молекулярной генетики человека
Отдела радиационной и молекулярной биофизики,
Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
188350, Ленинградская обл., г.Гатчина, мкр. Орлова роща, 1
(813 71)4-60-93, 8-921-3048187
Сайт института: <http://www.pnpi.spb.ru/>

pchelina_sn@pnpi.nrcki.ru


/Пчелина Софья Николаевна/

