

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора физико-математических наук, профессора РАН, члена-корреспондента РАН, Шайтана Алексея Константиновича на диссертационную работу Храмеевой Екатерины Евгеньевны

“Архитектура хроматина и ее регуляторная роль в клетках головного мозга”, представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.8 - Математическая биология, биоинформатика

Актуальность темы диссертационной работы. Диссертационная работа Екатерины Евгеньевны Храмеевой посвящена изучению архитектуры хроматина и ее регуляторной роли в клетках головного мозга, установлению роли трехмерной организации генома в регуляции функционирования человеческого мозга. Тема диссертационной работы лежит на стыке наиболее актуальных тем современной молекулярной биологии, а именно, изучения вопросов функционирования геномов и вопросов функционирования мозга. За последние годы достигнут существенный прогресс в понимании пространственной укладки генома, развиты новые экспериментальные и вычислительные методики, позволяющие исследовать структуру хроматина. В первую очередь к данным методам относится метод Hi-C. В то же время остается еще очень много фундаментальных вопросов, связанных с молекулярными механизмами формирования и изменения 3D структуры генома. Не до конца поняты механизмы формирования топологически ассоциированных доменов, образования жидких капель в структуре хроматина, формирования взаимодействий промоторов и энхансеров и т.д. Влияние этих механизмов на регуляцию конкретных генов также является слабо изученным, а для большинства генов и типов клеток вообще не изученным. Транскриптом тканей мозга является одним из самых разнообразных, со сложной регуляцией транскрипции на эпигенетическом уровне и уровне пространственной укладки генома. Изучение регуляции экспрессии генов в мозге является актуальным как с фундаментальной, так и с практической точки зрения для понимания патогенеза многих нейродегенеративных и психических заболеваний.

Структура и содержание диссертации.

Работа написана хорошим языком, легко читается и практически не содержит опечаток, сверстана в системе LaTeX обладает удобным интерактивным оглавлением, изложена на 209 страницах в виде трех глав, включает 46 рисунков и 3 таблицы. В работе элегантно в виде единого повествования изложены результаты большого числа работ автора, выполненные в разное время по разным проектам, но объединенные общей идеей разработки методов исследования структуры хроматина в клетках мозга человека и непосредственно исследованию данной структуры.

Во введении автором изложены общие сведения об устройстве хроматина в его современном понимании, заявлены цели и задачи диссертационной работы, сформулированы положения, выносимые на защиту, приведена информация о новизне, значимости и апробации работы.

Глава 1 «Обзор литературы» посвящена подробному изложению современных представлений об организации хроматина, в том числе в мозге человека, а также обзору современных методов изучения архитектуры хроматина.

Глава 2 «Материалы и методы» состоит из двух частей. В первой части представлена информация о стандартные используемые методах обработки данных экспериментов Hi-C. Во второй же части главы изложены результаты работы автора по разработке оригинальных методов анализа данных Hi-C. Данный раздел представляет одну из сутевых частей диссертации, подкрепленную значительным количеством публикаций. Автором предложены альтернативные подходы к интерпретации суммарной частоты контактов геномного региона, показана биологическая значимость данного параметра, получаемого из Hi-C экспериментов, разработаны оригинальные подходы выявления биологического сигнала в данных с высоким уровнем батч-эффектов, разработаны методы аннотации TADов, методы машинного обучения для изучения особенностей организации хроматина, а также методы анализа данных масс-спектрометрии для изучения липидного состава мозга человека.

Глава 3 «Результаты и обсуждение» разбита на три раздела в соответствие с основными направлениями исследований диссертационной работы. В разделе 3.1

приведены результаты работ автора по изучению общих принципов устройства хроматина на различных уровнях – уровнях хромосомных территорий, компартментов, ТАДов и хроматиновых петель. В частности, автором была продемонстрирована взаимосвязь пространственной организации хромосом и эволюционных событий перестроек между хромосомами на примере дрожжей рода *Saccharomyces*. При помощи методов разработанных автором была выявлена важная функция деацетилазы SIRT6 - участие в регуляции митохондриальных процессов в головном мозге через взаимодействие с транскрипционным фактором YY1, который является ключевым игроком в механизме экструзии петель в хроматине. На уровне изучения компартментов хроматина автором, в частности, было продемонстрировано, что компартментализация хроматина меняется во время сперматогенеза у плодовых мушек. Значительный блок работ был посвящен изучению организации хроматина на уровне ТАДов и влиянию взаимодействия с ядерной ламиной. Был предложен механизм формирования ТАДов у дрозофилы, основанный на способности нуклеосом в неактивном хроматине притягиваться друг к другу, и на отсутствии такой способности у ацетилированных нуклеосом. Была исследована иерархичность ТАДов отдельных клетках дрозофилы, показано, что в геноме отдельных клеток наблюдаются неиерархические ТАДы при разрешении Hi-C карт в 100 тыс. п.о. На уровне изучения петель хроматина работы автора были сосредоточены на изучении белка YY1, участвующего в образовании петель. В результате разностороннего биоинформатического анализа была сформулирована гипотеза о совместной регуляции генов белками YY1 и SIRT6, которая впоследствии была экспериментально подтверждена.

В разделе 3.2 изложены результаты по изучению организации хроматина в нейронах мозга человека. Совместно с соавторами Е. Е. Храмеевой была решена нетривиальная техническая задача получения Hi-C карт из образцов мозга человека. Были выполнены эксперименты Hi-C для региона мозга человека BA22p, показано, что межхромосомные взаимодействия в нейронах понижены. Были определены области, в которых происходит смена компартментов между нейронами и не-нейронами, показано, что ТАДы более выражены в нейронах по

сравнению с ненейрональными клетками, показано, что нейрональные петли более длинные. Отдельным интересным результатом диссертационной работы явилась идентификация особо длинных петель в хроматине нейронов, названных нейрональными точками, представляющих собой сильные контакты на большом расстоянии, которых перекрываются с пиками H3K27me3. Автором сделано предположение, что белки PcG подавляют гены ТФ в нейрональных точках. Показано, что в этих локусах, 80% являются транскрипционными факторами (ТФ), причем они значимо ассоциированы с развитием организма и нервной системы.

В разделе 3.3 изложены результаты по интеграции данных Hi-C с другими омиксными данными в контексте изучения мозга человека. Было проведено сравнение транскриптома тканей головного мозга человека с другими приматами, определены гены со специфичной для человека экспрессией. Был установлен, какие области мозга наиболее отличаются у человека в сравнении с другими приматами и, соответственно, быстрее эволюционируют: кора больших полушарий, внутренняя капсула, гипоталамус, серое и белое вещество мозжечка. В продолжении данной работы были выполнены исследования по сравнению транскриптомов клеток мозга между человеком и другими приматами с разрешением в одну клетку. Было установлено, что олигодендроциты и астроциты у человека отличаются от подобных клеток у остальных приматов больше, чем основные клетки мозга – нейроны. Отдельный блок работ был посвящен анализу эволюции липидного состава тканей мозга человека на основе сравнения аллельных вариантов различных генов человека и неандертальца, а также экспериментального анализа концентрации липидов у человека и более 30 видов млекопитающих. Показано, что у человека липидные изменения локализованы преимущественно в мозге, а человек-специфичные липиды преимущественно вовлечены в метаболические пути, связанные с когнитивными заболеваниями (болезни Альцгеймера, Паркинсона и др.). В заключение раздела обсуждается роль организации хроматина в регуляции специфичной для человека экспрессии в мозге, показывается, что энхансеры, генов, экспрессия которых специфична для человека,

находятся в областях генома, которые активно эволюционировали при формировании в человека (Human Accelerated Regions).

В заключении приводятся основные выводы диссертационной работы.

В целом диссертационная работа производит очень положительное впечатление, как по объему выполненных работ, научной и методологической значимости, так и по качеству ее оформления и подаче материала. **Научная новизна диссертационной работы** не вызывает сомнений, исследования, проведенные автором, находятся на передовом крае науки. Автором выявлены новые закономерности общего характера в организации хроматина на разных уровнях у разных организмов. Кроме этого, существенная новизна связана с исследованием структуры хроматина в клетках мозга, развиты новые протоколы получения Hi-C данных из клеток мозга, установлены закономерности организации хроматина в нейронах, установлен новый тип внутри хромосомных и межхромосомных контактов – нейрональные точки, выполнены пионерские работы по детальному анализу транскриптомов различных областей мозга у различных видов животных, включая человека.

Теоретическая и практическая значимость работы связана с главным образом с установлением новых механизмов, регулирующих экспрессию генов в клетках мозга, включая идентификацию ряда генов, таких как SIRT6 и YY1, активно участвующих в управлении структурой хроматина и влияющих на липидный метаболизм. Понимание данных механизмов закладывает рациональные основы для понимания патогенеза ряда нейродегенеративных и психических заболеваний, разработки подходов к их лечению.

Диссертационная работа обладает высокой **степенью обоснованности и достоверности выводов**, которая обеспечивается современными экспериментальными и вычислительными подходами, использованными в работе, проведении необходимого количества валидационных экспериментов и контрольных анализов, сравнением с литературными данными, а также

подтверждается публикацией результатов в ведущих рецензируемых журналах. Автором опубликовано по теме диссертации 39 статей, в ведущих мировых журналах, из них 31 в журналах Q1, включая такие журналы, как Genome Research, Nature Communications, Nucleic Acids Research, Developmental Cell и др. Результаты были доложены на 27 международных конференциях.

Текст диссертации и представленные в нем данные полностью обосновывают сделанные в работе выводы и выносимые на защиту положения. Автореферат диссертации полностью отражает ее содержание.

Представленная работа является фундаментальным законченным исследованием, которое является определяющим для формирования нового направления науки – изучения регуляторной роли хроматина в развитии и работе нервной системы.

В то же время к работе можно выдвинуть ряд замечаний и пожеланий:

- 1) Хотя лаконичность диссертационной работы является безусловным плюсом, в некоторых аспектах работа является слишком лаконичной, отчасти фрагментарной, логические связи между отдельными частями, параграфами, излагаемыми статьями, либо последовательностью научных работ не всегда легко прослеживаются. Не хватает некоторого обобщения и обсуждения полученных результатов в более широком контексте того, что известно в литературе. Часто на изложение достаточно большой работы, опубликованной в виде статьи, отводится один абзац, и сложно отделить собственные результаты автора от обсуждения и результатов других исследовательских групп, цитируемых в тексте. При изложении результатов автор часто переходит от обсуждения результатов, полученных на одном организме к другому, например, от дрозофилы к млекопитающим. Например, в разделе результатов 3.1.3 в первом абзаце излагаются результаты по анализу ТАДов у человека, со второго по пятый уже про анализ ТАДов у дрозофилы, а в шестом уже делается некоторое обобщение. При этом, вероятно, сами механизмы образования ТАДов у мухи и млекопитающих разные и эти вопросы требовали бы более детального обсуждения.

- 2) Результаты по регуляторной роли именно архитектуры хроматина в клетках головного мозга в основном представлены в разделе 3.2 и пока опубликованы в виде препринта, в то же время значительные части представленных в диссертационной работе исследований, выполненных на высочайшем научном уровне и опубликованных в высокорейтинговых журналах, относятся скорее к областям сравнительной геномики, транскриптомики, метаболомики, липидомики и эпигеномики. В этом плане название диссертационной работы могло бы быть более широким, чтобы включать эти области исследований.
- 3) В Главе 1 «Обзор литературы» следовало бы упомянуть концепцию «цветов хроматина», а в разделе 1.3 рассказать более подробно о различных методах изучения архитектуры хроматина. На стр. 41 не понятен термин «обратная ПЦР».
- 4) В разделе 2.2.4 интересно было бы узнать, предсказывают ли нейросети ГАДы лучше, чем линейные модели.
- 5) На стр. 31 не очень понятна фраза «Односторонняя экструзия не может быть встроена в существующий механизм модели петлевой экструзии из-за предположения о двусторонней экструзии».
- 6) Работа не лишена небольшого количества опечаток. На стр. 19 ИППИ, видимо, обозначен как «шшез», таблица 2 представлена в плохом качестве в печатном варианте.
- 7) При оформлении списка литературы по госту следует оставлять хотя бы трех авторов в библиографической записи, а не одного, тогда ссылки на многие работы автора включали бы ее фамилию тоже и проще было бы отличать работы автора, от других работ. Еще лучше приводить ссылки с DOI.
- 8) В работе присутствует ряд жаргонизмов. Например, термин экспрессия генов, часто заменяется на просто экспрессию. Например, в названии раздела «3.3.2 Роль организации хроматина в регуляции специфичной для человека экспрессии в мозге» можно понять слово экспрессия в своем базовом значении – «переживание, выражение чувств».

Несмотря на имеющиеся замечания, считаю, что диссертационная работа Храмеевой Екатерины Евгеньевны "Архитектура хроматина и ее регуляторная роль в клетках головного мозга" является законченной научно-квалификационной работой и отвечает требованиям п. 9 "Положения о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539; 26.09.2022 г. № 1690), а ее автор заслуживает присвоения искомой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.8 - Математическая биология, биоинформатика.

Официальный оппонент



Шайтан Алексей Константинович
доктор физико-математических наук
(специальность — 03.01.09 — Математическая биология, биоинформатика),
профессор РАН, член-корреспондент РАН,
доцент кафедры биоинженерии биологического факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Московский государственный университет
имени М. В. Ломоносова»

2 февраля 2024 г.

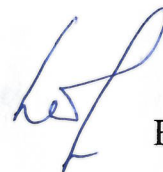
Контактные данные

Телефон: +7(495) 939-57-38; E-mail: shaytan_ak@mail.bio.msu.ru;

Почтовый адрес: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Подпись сотрудника биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова А.К. Шайтана удостоверяю:

Ученый секретарь биологического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова,



Е.В. Петрова

Заместитель декана биологического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор, д.б.н.



А.М. Рубцов