

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ

«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ и ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ИЦиГ СО РАН)

Пр-т. Академика Лаврентьева, д. 10, Новосибирск, 630090
Телефон: (383) 363-49-80
Факс (383) 333-12-78
E-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru
https://www.icgbio.ru
ИНН 5408100138/КПП 540801001
ОКПО 03533895 ОГРН 1025403657410

от 14.02.2024 № 15345-29-38/145
на № _____ от _____



«УТВЕРЖДАЮ»
и.о. директора ИЦиГ СО РАН
академик РАН
Кочетов А.В.

« 14 » 02 2024 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертационную работу **Храмеевой Екатерины Евгеньевны** на тему **«Архитектура хроматина и ее регуляторная роль в клетках головного мозга»**, представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.8 - математическая биология, биоинформатика

Актуальность диссертационной работы

Диссертационная работа Храмеевой Е.Е. представляет новое направление биоинформатики и математической биологии: разработка алгоритмов и программного обеспечения для исследования трехмерной (3D) архитектоники интерфазного ядра клеток головного мозга человека с использованием экспериментальных данных высокопроизводительного секвенирования по технологии захвата конформации хромосом (Hi-C). Эта технология предоставляет возможность определять частоты пространственных контактов между парами участков ДНК в полногеномном масштабе. Биоинформатический анализ таких 3D-контактов позволяет выявлять закономерности влияния пространственной архитектоники интерфазного ядра на регуляцию экспрессии генов. Актуальность этого нового направления научных исследований можно обозначить следующими пунктами.

Согласно текущим представлениям геномная ДНК внутри интерфазных ядер клеток млекопитающих упакована иерархически. Наивысшим иерархическим уровнем 3D-археитоники интерфазного ядра принято считать хромосомные территории: области расположения отдельных хромосом. В качестве следующего уровня иерархии обычно выделяют компартменты А и В, соответствующие преимущественно активно транскрибируемому и неактивным районам геномной ДНК. Компартмент А располагается ближе к центру ядра. Далее в этой иерархии рассматривают топологически ассоциированные домены (ТАД) – участки хромосом, для которых характерно обогащение контактами ДНК внутри участка и обеднение контактами с расположенными вне ТАДа последовательностями. Кроме того, в качестве более низкого иерархического уровня 3D-археитоники интерфазного ядра выделяют петли различного размера и, на самом низшем уровне, нуклеосомную упаковку ДНК. При этом экспрессия того или иного гена определяется укладкой хроматина несущего

его участка геномной ДНК, которая меняется по мере развития организма в результате тканевой дифференцировки клеток, а также в ответ на внутренние регуляторные сигналы и внешние воздействия окружающей среды. Поскольку молекулярные механизмы этих изменений как в норме, так и при патологиях все еще остаются далекими от их ясного понимания, то выявление закономерностей влияния 3D-архитектоники интерфазного ядра на регуляцию экспрессии генов является актуальной задачей для построения адекватной научной картины мира как фундаментальной основы прогресса биологии, медицины и фармацевтики.

Кроме того, в качестве объекта рассматриваемого диссертационного исследования были выбраны ядра клеток головного мозга человека, по которым количество свободно доступных экспериментальных данных весьма ограничено вследствие жестких норм этического контроля протоколов исследований на людях. Поисковые возможности биоинформатических инструментов, созданных в рамках диссертации Храмеевой Е.Е., стимулировали получение новых экспериментальных данных высокопроизводительного секвенирования Hi-C геномной ДНК из ядер клеток головного мозга человека, что повышает актуальность этой биоинформатической работы.

В постгеномную эру стало понятно, что только комплексное исследование и сопоставление многочисленных омиксных данных (геномных, эпигеномных, транскриптомных, протеомных, метаболомных) позволяет приблизиться к решению фундаментальной проблемы: расшифровке генов в геномной ДНК и предсказанию их функций. Разнообразие таких данных и их большой объем вызывает огромные трудности при обработке и анализе. В диссертационной работе Храмеевой Е.Е. были предложены методы для решения подобных комплексных задач, разработаны сложные алгоритмы для обработки взаимосвязанных данных различных молекулярных уровней. Храмеева Е.Е. в своей диссертационной работе предложила ряд важных новшеств при решении таких проблем, используя алгоритмы как классического биоинформатического анализа, так и искусственного интеллекта. Она применила их для сверхбольших массивов данных высокопроизводительного секвенирования Hi-C. Это достижение дополнительно увеличивает актуальность представленного ею нового научного направления математической биологии и биоинформатики.

Новизна исследования и полученных результатов

Характеризуя новизну рассматриваемого диссертационного исследования и его результатов, важно отметить усовершенствование Храмеевой Е.Е. алгоритмов биоинформатической обработки экспериментальных данных за счет явного учета в них важных деталей протоколов пробоподготовки и высокопроизводительного секвенирования Hi-C. Благодаря этим новшествам ей удалось впервые показать следующее:

- 1) нейроны достоверно отличаются от других типов клеток региона BA22p коры мозга человека по 3D-архитектонике их интерфазных ядер, что отражается в нейрон-специфических дальних контактах геномной ДНК, опосредованных белками семейства Polycomb и проявляющихся фенотипически в виде подавления экспрессии генов, кодирующих транскрипционные факторы, которые обычно активируются при нейрогенезе;
- 2) деацетилаза SIRT6 взаимодействует с белком YY1 при образовании хроматиновых петель в ядрах клеток головного мозга человека, вследствие чего биоинформатический анализ метаболомных профилей позволил обнаружить специфические для мозга липиды, различия по их содержанию между популяциями современных людей, а также метаболические изменения в коре при аутизме и ответе на антидепрессант флуоксетин;
- 3) достоверное обогащение геномных зон HAR (от англ. «Human Accelerated Regions» в значении «ускоренная эволюция на человеческой ветке») энхансерами как дистальными цис-элементами регуляции транскрипции генов в зависимости от наличия или отсутствия контактов этих регуляторных элементов с проксимальными районами промоторов соответствующих генов в 3D-архитектонике интерфазного ядра отражает вовлечение зон HAR в регуляцию экспрессии генов;

4) использование разработанного автором алгоритма взвешивания биологических повторностей с учетом общепринятых оценок их качества при обработке экспериментальных данных Hi-C позволяет существенно повысить точность и достоверность получаемых результатов.

Кроме того, разработка Храмеевой Е.Е. нового программного обеспечения для анализа данных высокопроизводительного секвенирования Hi-C, иммунопреципитации хроматина (ChIP-seq), транскриптомов (RNA-seq) и другой омиксной информации стимулировало проведение ряда новых экспериментов с получением такого рода данных для культуры HeLa клеток человека, а также для плодовой мушки (*Drosophila melanogaster*), курицы (*Gallus gallus*), мыши (*Mus musculus*), макаки (*Macaca mulatta*) и двух видов шимпанзе: обыкновенного (*Pan troglodytes*) и карликового (бонобо, *Pan paniscus*). «Изюминкой» диссертационной работы Храмеевой Е.Е. является разработка большинства предложенных ею алгоритмических новшеств путем явного учета существенных деталей протоколов экспериментального получения полногеномных данных: в частности, большего количества биологических повторностей благодаря снижению критериев этического контроля по сравнению с получением данных по людям. Применение соискателем оригинального программного обеспечения для обработки экспериментальных данных позволило выявить различия между биологическими видами и тканями по 3D архитектонике интерфазного ядра и ее влиянию на экспрессию генов в норме и при патологиях.

Наконец, комбинирование различных сочетаний исследуемых данных Hi-C с независимыми данными других омиксных технологий, взятыми автором из свободно доступных источников, позволило Храмеевой Е.Е. поставить ряд нестандартных задач комплексного биоинформатического анализа биаллельной транскрипции, альтернативного сплайсинга, некодирующих РНК, разделения «сигнал-шум» при изучении онкозаболеваний и успешно решить их в качестве примеров исследований мозга человека в заявленном направлении математической биологии и биоинформатики.

Все это вместе взятое убедительно свидетельствует о новизне предложенного соискателем направления математической биологии и биоинформатики и полученных в его рамках результатов.

Значимость для науки и практики полученных результатов

В рамках диссертационной работы Храмеевой Е.Е. было, прежде всего, создано новое программное обеспечение для комплексного биоинформатического анализа наборов больших экспериментальных данных высокопроизводительного секвенирования геномной ДНК в рамках широкого круга методик таких как Hi-C, RNA-seq и ChIP-seq, работоспособность которого была продемонстрирована ею на примерах решения содержательных задач молекулярной биологии, эволюционной генетики и медицины. Описание разработанных биоинформатических методов, алгоритмов и программного обеспечения было опубликовано высокорейтинговыми научными журналами, что свидетельствует о высоком уровне проведенной работы. В связи с этим можно заключить, что представленные в диссертационной работе уникальные биоинформатические методы могут найти широкое применение в дальнейших научных, а также клинических исследованиях.

В свою очередь, новые исследовательские возможности программного обеспечения, созданного в рамках диссертационного исследования Храмеевой Е.Е., стимулировало получение новых экспериментальных данных высокопроизводительного секвенирования о человеке и других животных. Это позволяет использовать их наряду с независимыми данными в качестве исходной информации для мета-анализа текущего состояния геномики, а также как обучающие и контрольные данные для разработки нового программного обеспечения для решения различных биоинформатических задач.

Наконец, представленные в диссертационной работе Храмеевой Е.Е. новые сведения о различиях 3D-архитектоники интерфазного ядра клеток головного мозга человека в норме и при патологиях может в перспективе способствовать более глубокому пониманию

патологических процессов, приводящих к развитию таких заболеваний, как аутизм, нейродегенеративные расстройства и онкозаболевания.

В целом, разработанные Храмеевой Е.Е. в ходе выполнения диссертационной работы методы и алгоритмы позволили получить ранее неизвестные научные факты о 3D-архитектонике интерфазного ядра клеток головного мозга человека, ее роли в регуляции экспрессии генов. Полученные автором результаты существенно уточняют и обогащают современные биологические представления в этой области науки.

В связи с этим было бы целесообразным включать материалы диссертации Храмеевой Е.Е. в учебные планы ВУЗов по специальности «1.5.8 - математическая биология, биоинформатика», а также в программы курсов повышения квалификации и факультативов на физических, естественно-научных, математических, информационно-технологических и медицинских факультетах ВУЗов.

Обоснованность и достоверность научных положений и заключений

Обоснованность и достоверность научных положений и заключений диссертации Храмеевой Е.Е. обеспечивается продуманным использованием современных биоинформатических методов, для которых были предложены существенные усовершенствования, оценением статистической значимости промежуточных и итоговых результатов, а также адекватным сравнением с независимыми данными других авторов.

Объективным свидетельством соответствия диссертации Храмеевой Е.Е. высокому мировому уровню биоинформатики и математической биологии является публикация ее материалов в 39-ти статьях в высокорейтинговых журналах, индексируемых международными реферативными системами Scopus и/или Web of Science Core Collection.

Характеризуя личный вклад Храмеевой Е.Е. в настоящую диссертационную работу стоит отметить, что в 9 из 39 вышеуказанных публикаций она является первым автором. Кроме того, в 9 из 30 оставшихся статей она была автором для переписки. Наконец, в остальных работах в качестве авторского вклада было отмечено выполнение соискателем биоинформатического анализа экспериментальных данных, полученных ее со-авторами (например, индикатор «formal analysis» в разделе «Author Contributions» статьи Shcherbinina et al, *Biomedicines*. 2022; 10(6):1397. doi: 10.3390/biomedicines10061397. Импакт-фактор: 4.7, квартиль: Q1 по *Web of Science*). Все это вместе взятое свидетельствует об определяющем личном вкладе Храмеевой Е.Е. в ее диссертационную работу по специальности «1.5.8 - математическая биология, биоинформатика».

Оценка содержания диссертационной работы и ее завершенности

Рассматриваемая диссертационная работа объемом 209 машинописных страниц построена по традиционному плану, который включает «Введение» (18 стр.), главы «Обзор литературы» (22 стр.), «Материалы и методы» (51 стр.) и «Результаты и обсуждение» (59 стр.), а также обязательный раздел «Заключение», где Храмеева Е.Е. на двух страницах обобщила представленные результаты в основных выводах. Кроме того, в диссертации имеются списки публикаций автора по теме диссертации, сокращений и условных обозначений, а также цитируемой литературы, где указано 232 наименования. Текст диссертационной работы является кратким, лаконичным, логичным, легким для чтения и восприятия, а также достаточно грамотным. Храмеева Е.Е. очень уместно и умело проиллюстрировала диссертацию с помощью 46 рисунков и 3 таблиц. Автореферат адекватно отражает основное содержание диссертации.

В обязательном разделе «Введение» Храмеева Е.Е. обосновала актуальность выбранного нового научного направления математической биологии и биоинформатики в качестве темы ее диссертации. В установленных таким образом рамках она поставила цель диссертационного исследования и список задач, последовательное решение которых позволило ей достичь эту цель, аргументировав это Положениями, выносимыми на защиту. Кроме того, в этом разделе соискатель охарактеризовала степень новизны созданного ею программного обеспечения и полученных с его помощью результатов. Далее, автор представила свидетельства достоверности этих результатов и их научно-практической

значимости. Наконец, здесь Храмеева Е.Е. дала общую характеристику объема, структуры и содержания своей диссертации, включая ее апробацию на международных и российских конференциях, а также публикации по теме исследования и свой личный вклад в них.

В главе «Обзор литературы» Храмеева Е.Е. очень уместно сначала знакомит читателя с общими принципами организации хроматина, чтобы на этой основе сфокусировать внимание на современном состоянии исследований и существующих методах изучения архитектуры хроматина в мозге человека. Подводя итог своего аналитического обзора, автор констатирует отсутствие до настоящего момента в математической биологии и биоинформатике универсальных методов изучения 3D-архитектоники интерфазного ядра клеток мозга человека, тогда как принято считать, что такие методы несомненно представляют ценность для исследований в генетике и медицине.

Главу «Материалы и методы» соискатель удачно структурировала двумя разделами, в первом из которых она детально описала использованные стандартные методы обработки данных, во втором – оригинальное программное обеспечение для анализа экспериментальных данных высокопроизводительного секвенирования, разработанное в рамках диссертационной работы.

В самой объемной главе диссертации «Результаты и обсуждение» Храмеева Е.Е. сначала последовательно представляет свои промежуточные результаты изучения общих принципов 3D-архитектоники интерфазного ядра широкого круга типов клеток с различной видовой и тканевой принадлежностью по мере разработки, отладки и оптимизации оригинальных биоинформатических инструментов. Затем она описывает закономерности 3D-архитектоники интерфазного ядра клеток мозга человека, которые обнаружены благодаря применению этих инструментов для анализа уникальных экспериментальных данных Hi-C. Наконец, заключительный раздел этой главы демонстрирует возможности обнаружения новых сведений о 3D-архитектонике интерфазного ядра в клетках мозга человека за счет комбинирования созданных Храмеевой Е.Е. биоинформатических инструментов со стандартным программным обеспечением омиксных технологий. Выбор Храмеевой Е.Е. столь удачной логики изложения этой главе диссертации позволил ейкратно сократить объем текста благодаря обсуждению каждого результата сразу же вслед за его представлением, что также облегчило чтение и восприятие работы.

Все вышеперечисленное позволяет резюмировать успешное достижение соискателем цели ее диссертационного исследования благодаря исчерпывающему решению всех поставленных ею задач в полном объеме и констатировать завершенность работы. Выводы Храмеевой Е.Е. обобщают ее оригинальные результаты так, как она сформулировала это в Положениях, выносимых на защиту.

Замечания по содержанию диссертации

Несмотря на общую высокую оценку диссертации Храмеевой Е.Е., к представлению материалов в ней возник ряд следующих незначительных замечаний редакционного характера.

Прежде всего, бросается в глаза избыточность Положений, выносимых на защиту, половина которых (Положения №№ 5, 6, 8, 10, 11, 12, 14) уже исчерпывающе раскрыла тему ее диссертации «Архитектура хроматина и ее регуляторная роль в клетках головного мозга». Бесспорно, остальные Положения, выносимые на защиту, отражают очень интересные и исключительно важные, но все-таки промежуточные, результаты о клетках различной видовой и тканевой принадлежности, которые были получены автором по мере разработки, отладки, оптимизации и верификации нового программного обеспечения, предназначенного для анализа 3D-архитектоники интерфазного ядра и ее роли в регуляции экспрессии генов в ядрах клеток мозга человека согласно теме диссертации.

Кроме того, не удалось найти в ней ответов на ряд концептуальных вопросов, среди которых были такие:

1. Как соотносятся результаты диссертации о 3D-архитектонике интерфазного ядра клеток головного мозга человека согласно исследованным в ней данным высокопроизводительного секвенирования

Ni-C с одной стороны и, с другой стороны, предшествующие им представления об упаковке геномной ДНК во «фрактальный клубок» в рамках теории Леонида Мирного (MIT, USA): как они подтверждают, опровергают, уточняют или расширяют друг друга

2. Как соотносятся выявленные соискателем различия по 3D-архитектонике интерфазного ядра между нейронами и другими типами клеток мозга человека (например, астроцитами) с тем, что можно было *a priori* ожидать в рамках самых общих биологических знаний о размерах ядер нейронов и астроцитов: в чем они согласуются друг с другом, а что стало неожиданным?

Досадно огорчает некоторая небрежность оформления диссертации: например, на рисунке 3а встретилась надпись “i-th pixel” по-английски, а литературный источник №8 в разделе «Публикации автора по теме диссертации» потерял название журнала «Биотехнология».

Тем не менее, эти замечания ни в коей мере не умаляют высокую оценку научного уровня диссертационной работы Храмеевой Е.Е., ее результатов и Положений, вынесенных ею на защиту.

Заключение

Диссертационная работа Храмеевой Екатерины Евгеньевны на тему «Архитектура хроматина и ее регуляторная роль в клетках головного мозга» представляет законченное научное исследование, выполненное соискателем на высоком методическом уровне, который обеспечил как создание оригинального программного обеспечения, так и получение с его помощью достоверных результатов. Автор обсудила эти результаты в сравнении с независимыми литературными данными и обобщила в качестве ее выводов, как это сформулировано в Положениях, вынесенных на защиту, обоснованность которых не вызывает сомнений. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости рассматриваемая диссертационная работа Храмеевой Е.Е. 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 специальности 1.5.8 – математическая биология, биоинформатика.

Отзыв на диссертацию был заслушан и утвержден на заседании межлабораторного семинара по молекулярной генетике, клеточной биологии и биоинформатике ИЦиГ СО РАН (Протокол №2 от 12 февраля 2024 года).

Ведущий научный сотрудник, и.о. зав.сектором регуляторной компьютерной геномики ИЦиГ СО РАН, д.б.н. (1.5.8 – математическая биология, биоинформатика), e-mail pon@bionet.nsc.ru

Пономаренко

М.П. Пономаренко

Председатель межлабораторного семинара по молекулярной генетике, клеточной биологии и биоинформатике ИЦиГ СО РАН, к.б.н., доцент, e-mail ada@bionet.nsc.ru

Афонников

Д.А. Афонников

Ученый секретарь ИЦиГ СО РАН, к.б.н.



Орлова

Г.В. Орлова