

Отзыв

официального оппонента на диссертацию Кононковой Анны Дмитриевны “Структура хроматина дрозофилы в контексте влияния белков ядерной периферии и процессов, ассоциированных с ранними стадиями сперматогенеза”, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.8 - Математическая биология, биоинформатика

Актуальность темы диссертации

Диссертация Анна Кононковой посвящена трехмерной архитектуре генома у дрозофилы. Одним из базовых методов для получения информации о пространственных взаимодействиях хроматина является протокол Hi-C и дрозофила была одним из первых организмов, для которого появились данные о трехмерной архитектуре хроматина на основе этого подхода. Структура хроматина плодовой мушки имеет ряд сходств и отличий от таковой у млекопитающих, однако их всесторонний анализ осложняется ограниченностью имеющихся на сегодняшний день данных о хроматиновых взаимодействиях у данного вида, поскольку основной объем исследований приходится на эмбриональные клеточные линии. Изучение структуры хроматина в других типах клеток, в особенности в динамике и в контексте изменения профиля экспрессии, представляется особенно актуальным с точки зрения формирования общих представлений об особенностях трехмерной укладки генома у разных организмов и задает границы переноса закономерностей, характерных для хроматина дрозофилы, на другие виды, в частности, млекопитающих. Кроме того, в диссертационной работе А.Д. Кононковой освещается роль нуклеопорина Elus в компактизации хроматина у дрозофилы. Учитывая последние данные о взаимосвязи между возрастными изменениями клетки, структурой

хроматина и его ассоциации с ламиной, привлечение информации о роли других белков ядерной периферии становится особенно важным для получения более полной картины изменений, которыми сопровождается нормальное старение и патологические состояния, затрагивающие белки ядерной поры.

Структура и содержание

Диссертация А.Д. Кононковой изложена на 109 страницах в трех главах и содержит введение, заключение, 33 рисунка, 5 таблиц и приложение. Список литературы насчитывает 125 публикаций.

Название работы в полной мере отражает ее содержание, поскольку достаточно общая тема структуры хроматина у дрозофилы раскрывается здесь в двух независимых направлениях исследования, первое из которых освещает изменения структуры хроматина на ранних стадиях сперматогенеза, а второе - влияние нуклеопорина Elys на компактизацию хроматина в эмбриональной клеточной линии.

Во введении обосновывается актуальность темы, научная новизна и практическая значимость, формулируются цель и задачи исследования, а также положения, выдвинутые на защиту. Первая глава диссертации посвящена систематизации литературы по соответствующей теме и построена по принципу "от общего к частному". В начале главы приводится краткий обзор подходов к исследованию трехмерной структуры хроматина. Затем приводится сжатая характеристика основных единиц структуры хроматина, выявленных с применением протокола Hi-C, у разных видов. Следующий параграф содержит наиболее актуальные сведения об особенностях трехмерной архитектуры генома непосредственно у дрозофилы. Еще один раздел первой главы содержит информацию о белках периферии (ламинах и нуклеопоринах) в контексте тематики диссертации. В последнем параграфе перечислены основные

этапы сперматогенеза дрозофилы и особенности его протекания, существенные с точки зрения возможного влияния на структуру хроматина.

Во второй главе изложены материалы и методы, которые применялись на разных этапах исследования. Здесь описываются как стандартные методы анализа данных Hi-C, реализованные в виде готовых программ, так и оригинальные для работы А. Д. Кононковой решения. Перечислены все этапы процессирования данных, начиная с предобработки и анализа качества данных и заканчивая сравнительным анализом конкретных единиц структуры хроматина. В главе также описаны принципы разделения изучаемых объектов на группы, параметры запуска программ и многочисленные детали анализа, дающие возможность воспроизвести полученные результаты. В конце главы приведены основные программы и источники данных, использованных в работе.

В третьей главе описаны результаты исследования. Первый раздел посвящен динамике структуры хроматина на ранних стадиях сперматогенеза дрозофилы. В разделе приводятся результаты сравнения различных паттернов хроматина на разных масштабах взаимодействий в контексте изменения транскрипции, обусловленной активацией большого числа генов на стадии сперматоцитов. Второй раздел освещает те изменения в структуре хроматина дрозофилы, которые могут быть обусловлены не столько изменением профиля транскрипции, сколько изменением объема ядра. Наконец, третий раздел главы содержит результаты сравнительного анализа плотности упаковки хроматина в клетках S2 дрозофилы при деплеции нуклеопорина Elys и в контрольных клетках на разных уровнях трехмерной организации генома. Каждый из разделов сопровождается краткими обсуждениями полученных результатов.

Основные выводы по результатам исследования изложены в разделе Заключение. Работа дополнена списком таблиц, рисунков, условных обозначений и приложением.

Научная новизна

Новизна результатов, полученных в исследовании, обусловлена как уникальностью самого материала (ранее структура хроматина на каких-либо стадиях сперматогенеза дрозофилы не изучалась, а эксперимент по деплеции нуклеопорина Elys является уникальным в своем роде), так и оригинальностью приведенного анализа. Так, наряду с достаточно подробным описанием динамики изменения основных паттернов структуры хроматина, выявленных классическими методами анализа данных Hi-C, в диссертационной работе раскрываются проблемы, касающиеся взаимосвязи между повышением частоты контактов генов и их сходной функциональностью, а также возможности ярко выраженного перехода между компартментами или высокой экспрессионной активности в условиях локализации генов в неактивном компартменте. Кроме того, данные по сперматогенезу никогда прежде не рассматривались в качестве возможного источника дополнительной информации об ассоциации между структурой хроматина и размером ядра, и здесь также важную роль играет выбор объекта исследования, т. к. именно дрозофила обладает рядом биологически обусловленных преимуществ для такого рода анализа.

Практическая и теоретическая значимость

Практическая значимость диссертации заключается в изложенных методических решениях, которые могут применяться для анализа структуры хроматина не только у дрозофилы, но отчасти и у других видов. Полученные в работе результаты расширяют существующие представления о трехмерной архитектуре генома у данного вида и раскрывают роль некоторых влияющих на нее факторов и процессов. Теоретическая значимость диссертации А.Д. Кононковой обусловлена также

неизбыточностью полученных результатов с точки зрения имеющихся на сегодня данных о структуре хроматина, поскольку число исследований, в которых рассматривается влияние белков ядерной периферии или изменения размера ядра, представлено всего лишь несколькими работами. Не менее важной является информация о динамике хроматина при активации сперматоцитспецифичных генов, так как масштабы изменений уже сформированных паттернов хроматина при запуске транскрипции столь большого числа генов довольно слабо освещены в литературе.

Обоснованность научных положений и достоверность результатов

Представленные в работе научные положения и выводы являются результатом всестороннего анализа данных о пространственных взаимодействиях, совместно с данными по экспрессии генов, эпигенетическим состояниям хроматина и другой дополнительной информацией, которые вместе дают согласованную картину наблюдаемых изменений. Обоснованность научных положений обусловлена в том числе соответствием качества проведенного анализа общепринятым стандартам, например, обязательным включением в исследование контрольных групп генов и образцов, наличие не менее двух повторностей для каждого эксперимента, а также корректным применением методов оценки статистической значимости. Достоверность основных результатов не вызывает сомнения, подтверждается публикациями в ведущих научных изданиях, входящих в перечень Web of Science или Scopus и участием в конференциях. Автором опубликовано две статьи в журналах Nucleic Acids Research и Communicatinos Biology. Кроме того, выводы диссертации хорошо соотносятся с уже сложившимися и описанными в литературе представлениями в контексте данной тематики.

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 вносит важный вклад в понимание структуры 3Д-генома, его изменений при развитии живых организмов и механизмов, обуславливающих его поддержание.

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

- 1) Присутствует небольшое количество опечаток, например, на стр. 81 «Р-значение < 10-05».
- 2) Подписи к некоторым графикам не информативны, не объясняют сути изображенных на них данных. Например, Рисунок 5 – не объяснено, какой тип графика представлен на панелях а-в.
- 3) Вопросы вызывает использование термина «убиквитные гены». В поиске в интернете такое сочетание не встречается на русском. Используется ли оно в литературе на русском языке? Есть ли альтернативы уже использующиеся в русском языке. Стоило ли вводить этот новый термин?
- 4) Вызывает некоторые вопросы характеристика, называемая автором «степень выраженности компартмента». Что конкретно понимается под этой характеристикой? Почему ее расчет ведется через усреднение частоты контактов по первой квантили главной компоненты? Что будет, если ВВ компартмент маленький, но очень плотный, компактный. Будет ли это интуитивное представление выраженности совпадать с численными характеристиками.
- 5) Дискуссионный вопрос: в работе много говорится о 3Д геноме, но фактически анализ делается на основе двумерных усредненных карт. Интересно было бы узнать, как автор представляет себе трехмерный вид компартмента? Например, выраженный небольшой ВВ компартмент – это что в реальности? Маленькая глобула или что-то еще?

- 6) Интересно было бы узнать, как определялись сайты связывания Elys, почему для этого не подходит метод ChiP-seq, в чем преимущество метода DamID, и как он работает.
- 7) Вопрос дискуссионный: недавно была опубликована статья Афанасьева и др. «The probability of chromatin to be at the nuclear lamina has no systematic effect on its transcription level in fruit flies» (2024, Epigenetics & Chromatin). Авторы утверждают, что на основе моделирования показывают, что «probability of chromatin being in contact with the nuclear envelope has no systematic, causal effect on the transcription level in Drosophila». Просьба пояснить мнение автора по этому выводу, значит ли вывод статьи, что авторы, считают, что делеция белков ламины не приводит к изменению транскрипции в ТАДах, находящихся около ламины? Просьба пояснить, как в контексте данной дискуссии следует интерпретировать положение диссертации «Деплеция нуклеопорина Elys приводит к изменению плотности упаковки хроматина, сопоставимому с наблюдаемым при деплеции белков ламины». Имеются ли противоречия во взгляде автора диссертации и авторов вышеупомянутой статьи на вопрос влияния белков ламины на изменение плотности упаковки и транскрипцию?

Несмотря на имеющиеся замечания и вопросы, считаю, что диссертационная работа Кононковой Анны Дмитриевны “ Структура хроматина дрозофилы в контексте влияния белков ядерной периферии и процессов, ассоциированных с ранними стадиями сперматогенеза” 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 кандидата 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,
профессор кафедры биоинженерии биологического факультета
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Московский государственный университет
имени М. В. Ломоносова»

26.12.2024 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 заверяю:

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

Е.В. Петрова

Декан биологического факультета

МГУ имени М.В. Ломоносова, академик РАН, д.б.н. М.П. Кирпичников

