

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Пановой Александры Витальевны

«Вариабельность эпигенетического состояния инактивированной X-хромосомы в женских плюрипотентных стволовых клетках человека *in vitro*»,

представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук

по специальности 03.02.07 – генетика.

Диссертационная работа Пановой А.В. посвящена изучению особенностей эпигенетического состояния инактивированной X-хромосомы в женских линиях плюрипотентных стволовых клеток человека и возможностей его регулирования. Результаты данного исследования вносят вклад в понимание эпигенетических механизмов регуляции дозовой компенсации X-хромосомы на ранних этапах развития человека, дают возможность более точно характеризовать эпигенетическое состояние X-хромосомы, что является актуальной задачей при моделировании X-сцепленных заболеваний, где необходима точная характеристика состояния X-хромосомы как в ИПСК, так и после дифференцировки. Практическая ценность работы заключается в разработке технологии культивирования ПСК человека в наивных условиях, приближающих клетки *in vitro* к их природному аналогу *in vivo*.

Плюрипотентные стволовые клетки являются уникальным объектом для изучения эпигенетических механизмов раннего эмбрионального развития и регуляции работы генов. Представленная диссертационная работа посвящена изучению эпигенетических процессов плюрипотентного состояния клеток человека на примере инактивации X-хромосомы в женских плюрипотентных стволовых клетках человека. Наличие двух X-хромосом в женских клетках млекопитающих дает возможность изучения эпигенетических процессов: на ранних этапах эмбрионального развития происходит каскад событий, приводящих к гетерохроматинизации одной из X-хромосом в соматических клетках. В соматических клетках одна из X-хромосом инактивирована, а в плюрипотентном состоянии клетка может нести 2 активные X-хромосомы. Механизмы инактивации X-хромосомы, связь плюрипотентного состояния с регуляцией активности X-хромосомы и многие другие аспекты ранее в основном изучали на мышинных моделях, поэтому многие эпигенетические процессы, происходящие при инактивации X-хромосомы на ранних этапах развития у человека, до сих пор остаются невыясненными. Последнее определяет актуальность фундаментального научного исследования, проведенного соискателем. Практическая актуальность и значимость работы Пановой А.В. связаны с изучением возможности реактивации X-хромосомы в различных линиях ИПСК при эпигенетическом репрограммировании до наивного состояния.

В представленной работе с помощью современных генетических и молекулярно-биологических методов изучены эпигенетические характеристики инактивации X-хромосомы в женских плюрипотентных стволовых клетках: экспрессия гена XIST, запускающего процесс инактивации, распределения гистоновых модификаций на X-

хромосоме, время репликации, паттерн распределения 5-гидроксиметилцитозина (5-гмЦ) – промежуточного продукта процесса активного деметилирования ДНК. Впервые показано с помощью детекции времени репликации, что в тех клеточных линиях ЭСК и ИПСК, где наблюдается частичная активная X-хромосома, неактивными остаются перичентромерный район и дистальный конец q-плеча X-хромосомы. Помимо этого, впервые показано, что именно время репликации и распределение 5-гмЦ могут являться хорошими маркерами состояния активности X-хромосомы. Также впервые показано, что степень компактизации хроматина инактивированной X-хромосомы не коррелирует с её активностью.

Вторая часть работы посвящена изучению возможности регулирования состояния инактивированной X-хромосомы и возможности её реактивации с помощью ранее опубликованных протоколов. Для 5 линий ЭСК и 3 линий ИПСК при культивировании в т.н. «наивных» условиях, т.е. в условиях, которые могут приводить к состоянию истинной плюрипотентности, показан ряд эпигенетических событий, в т.ч. частичная реактивация X-хромосомы. Впервые показано, что при частичной реактивации «наивными» условиями районы X-хромосомы, устойчивые к реактивации, практически соответствуют аналогичным районам, обнаруженным в линиях ЭСК и ИПСК в обычных условиях культивирования. При этом процесс перехода в «наивное» состояние линиеспецифичен и не приводит к полной реактивации X-хромосомы.

Диссертационная работа Пановой А.В. изложена на 98 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений, список цитируемой литературы. Диссертация содержит 24 рисунка и 6 таблиц. Библиографический указатель содержит 87 источников.

Во Введении лаконично изложено современное состояние исследований в соответствующей области науки, обоснована актуальность темы диссертации, ее практическая значимость и новизна, сформулированы цель и задачи исследования, приведены положения, выносимые на защиту.

Глава «Обзор литературы» логично состоит из двух основных частей, посвященных, соответственно, плюрипотентным стволовым клеткам и инактивации X-хромосомы. Причем, если первую часть можно рассматривать как образовательный текст с достаточным количеством современного материала (можно смело использовать как учебную литературу), то вторая часть оставляет ощущение фрагментарности и противоречивости сведений о таком, казалось бы, хорошо изученном процессе, как инактивация X-хромосомы. Причиной тому - не недоработка автора, а объективно расплывчатое и фрагментарное современное состояние знаний в этой области, подчёркивающее важность и актуальность продолжения исследований, в том числе, подобных представленному А.В.Пановой.

Глава «Материалы и методы» впечатляет разнообразием материалов и методов, использованных при выполнении работы. Основные методы исследования включали культивирование линий стволовых клеток человека, иммуногистохимическое окрашивание, ДНК- и РНК-флуоресцентная гибридизацию *in situ*, определение времени

репликации с помощью пульс-мечения модифицированным нуклеозидом, анализ степени компактизации территорий X-хромосом, ПЦР, ПЦР в реальном времени, спонтанную дифференцировку плюрипотентных стволовых клеток.

Глава «Результаты» содержит четыре раздела и описывает результаты проведенного диссертантом исследования. В первом разделе главы «Результаты» соискатель описывает результаты своих исследований в области инактивации X-хромосомы в ЭСК человека. Представлены результаты исследования экспрессии гена XIST, гистоновых модификаций X-хромосомы, экспрессии X-сцепленных генов, времени репликации неактивной X-хромосомы, гидроксиметилирования ДНК. Кроме того, изучены хромосомные территории как отражение активности X-хромосомы. Таким образом, исследован весь спектр явлений и параметров, изменения которых могут свидетельствовать о статусе активности X-хромосомы и динамике его изменений.

Второй раздел главы «Результаты» посвящен изучению инактивации X-хромосомы в ЭСК при репрограммировании до наивного состояния. В частности, проверено предположение, что при переводе ЭСК человека в наивное состояние должна происходить реактивация X-хромосомы, аналогично наивным ЭСК мыши. Проведена характеристика линий чЭСК в «наивных» культуральных условиях, определены основные параметры, изменения которых могут свидетельствовать о статусе активности X-хромосомы. В результате показано, что культивирование ЭСК человека в наивных условиях привело к значительным эпигенетическим изменениям неактивной X-хромосомы, однако эти изменения не приводили к полной реактивации второй X-хромосомы и различались между линиями ЭСК человека.

В третьем разделе главы приводятся результаты изучения инактивации X-хромосомы в плюрипотентных клетках человека, полученных репрограммированием из соматических. Соискателем показано, что ИПСК человека с инактивированной X-хромосомой, так же, как и ЭСК человека, могут иметь как релаксированную, так и компактную хромосомную территорию неактивной X-хромосомы, т.е. степень компактизации X-хромосомной территории не коррелирует со временем репликации неактивной X-хромосомы и с активностью X-хромосомы. Таким образом, состояние компактизации X-хромосомы не может являться маркером её активности.

Четвёртый раздел посвящен изучению инактивации X-хромосомы в ИПСК человека, полученных при репрограммировании в наивных условиях. Сделано заключение, что в ИПСК, полученных в наивных условиях, как из клеток фибробластов, так и из клеток HUVES, наблюдается гетерогенность по времени репликации X-хромосомы между клетками внутри одной линии.

Обсуждение результатов вынесено в отдельную главу, что стоит отметить как положительную характеристику диссертационной работы. В этой главе на основе полученных соискателем результатов обсуждаются четыре аспекта: варибельность инактивации X-хромосомы в ПСК человека, сравнение ЭСК и ИПСК; новые маркеры, отражающие состояния инактивации X-хромосомы для ПСК человека; варибельность между линиями ПСК в наивных условиях плюрипотентности; устойчивое частично

активное состояние X-хромосомы во всех линиях ПСК человека. Проводится логика проделанного исследования, аргументируется постановка гипотез и задач, суммируются выводы из полученных результатов.

В Заключении, в частности, отмечается, что использование новых оригинальных маркеров инактивации позволило на более детальном уровне представить эпигенетические характеристики инактивируемой X-хромосомы и продемонстрировать, что при генетическом репрограммировании из соматического в плюрипотентное состояние может происходить частичная реактивация X-хромосомы. В работе впервые показано, что время репликации X-хромосомы отражает районы реактивации и может являться маркером состояния X-хромосомы в ПСК человека. Впервые показано, что распределение маркера активного деметилирования 5-гидроксиметилцитозина совпадает с эухроматиновыми районами и участками ранней репликации и может служить маркером состояния X-хромосомы в ПСК человека.

Выводы, сделанные автором, хорошо аргументированы и соответствуют поставленным задачам.

К диссертационной работе имеются следующие замечания и вопросы:

- 1) В клеточном ядре хромосомы занимают определённые неперекрывающиеся территории. При этом считается, что неактивный гетерохроматин более плотно упакован и более компактизован в ядре. В своей работе соискатель для характеристики степени компактизации хроматина X-хромосомы сравнивал между собой территории двух X-хромосом одного ядра на плоских препаратах интерфазных ядер трёх линий ЭСК человека. Сравнение территорий хромосом осуществляли с помощью разработанной программы и сравнения значений дисперсий для каждой индивидуальной хромосомы. Интересен алгоритм сравнения степени компактизации хромосом, именно поэтому к нему хотелось бы больше аргументации, а также иллюстративного материала. В частности, насколько обосновано использование модели именно нормального распределения. Здесь помог бы, например, рисунок с изображением реально полученного в эксперименте распределения. Также не аргументировано, почему в качестве конечной метрики используется σ^2 – ведь целью является оценка хромосомной территории, т.е., объема, а не площади. Интересно, насколько изменились бы выводы из этого эксперимента, если бы были применены метрики, альтернативные принятым в работе.
- 2) На рис. 10 использована запись гистонового кода, не соответствующая принятой на сегодняшний день номенклатуре. При этом в подписи к рисунку современная номенклатура соблюдена. Имеет смысл унифицировать обозначения на рисунке и в подписи, желательно – в пользу современной номенклатуры.

В целом диссертационная работа Пановой А.В. выполнена на высоком научном уровне, представляет собой объемное и разностороннее исследование, выполненное на высочайшем методологическом уровне, и предъявляемые замечания никак не умаляют научной значимости проделанной работы.

Заключение

Содержание работы полностью отражено в 3 статьях, которые опубликованы в журналах, соответствующих Перечню ВАК России для опубликования основных научных результатов диссертации. Полученные автором данные представлены в виде 5 тезисов докладов и материалов конференций.

Достоверность полученных автором результатов и сделанных на их основе выводов не вызывает сомнений. Основные результаты были получены лично автором, либо при её непосредственном участии. Полученные результаты могут быть использованы в научно-исследовательских работах, а в перспективе могут иметь весомое прикладное значение.

Автореферат диссертации полностью отражает основное содержание диссертации. Таким образом, диссертация Пановой Александры Витальевны «Вариабельность эпигенетического состояния инактивированной X-хромосомы в женских плюрипотентных стволовых клетках человека *in vitro*» является законченной оригинальной работой, научное и практическое значение которой в области генетики не вызывает сомнений. По своему содержанию, уровню выполнения научных исследований, научной новизне и практической значимости полученных результатов диссертация полностью отвечает требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям; а ее автор Панова Александра Витальевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика (биологические науки).

Руководитель лаборатории

эпигенетики ФГБНУ «МГНЦ»

д.б.н., доцент по специальности

03.02.07 – генетика

Стрельников Владимир Викторович

«05» марта 2018 г.

Федеральное государственное научное учреждение «Медико-генетический научный центр» Россия, 115522, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1, телефон 8(499)612-86-07, адрес электронной почты mgnc@med-gen.ru

Подпись Стрельникова В.В. заверяю

Учёный секретарь

ФГБНУ «МГНЦ»,

к.м.н.



Воронина Е.С.