

## Отзыв

**официального оппонента на диссертационную работу Пановой Александры Витальевны «Вариабельность эпигенетического состояния инактивированной X-хромосомы в женских плюрипотентных стволовых клетках человека *in vitro*», представленной на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.**

### Актуальность работы

Представленная диссертационная работа А.В. Пановой направлена на исследования важнейших аспектов биологии плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) человека и эпигенетических механизмов, связанных с инактивацией и реактивацией X-хромосомы.

Инактивация X-хромосомы у самок млекопитающих – ключевой эпигенетический феномен раннего развития, механизмы которого возможно исследовать на модели плюрипотентных клеток. Нарушения инактивации в эмбриогенезе приводит к гибели плода, а в постнатальном периоде часто являются причиной развития онкологических и аутоиммунных заболеваний. При репрограммировании к плюрипотентному состоянию соматических клеток с неактивной X-хромосомой может происходить её реактивация. Тесная связь плюрипотентного состояния с активностью X-хромосом, выявленная у мыши, оказалась несвойственной клеткам человека. Плюрипотентные стволовые клетки человека с нормальным диплоидным набором аутосом и двумя X-хромосомами имеют гетерогенный эпигенетический статус одной из X-хромосом, который может изменяться при культивировании. Вопросы о регуляции процессов инактивации и реактивации X-хромосом у человека до сих пор остаются невыясненными. В связи с этим для исследователей плюрипотентных стволовых клеток человека актуальными на сегодняшний день являются следующие задачи: разработка методических подходов и выбор новых маркеров, отражающих статус X-хромосом, систематическое исследование гетерогенности культур по эпигенетическому и транскрипционному состоянию X-хромосом, подбор условий культивирования,

позволяющих направленно влиять на состояние X-хромосом. Диссертационная работа А.В. Пановой посвящена решению именно этих задач.

### **Структура работы и основные результаты**

Диссертационная работа Пановой А.В. изложена на 98 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список сокращений, список цитируемой литературы. Диссертация содержит 23 рисунка и 6 таблиц. Библиографический указатель содержит 87 источников.

Во введении обосновывается актуальность диссертационного исследования; формулируется цель и основные задачи работы; описывается предлагаемый автором подход к решению поставленных задач; характеризуется степень новизны полученных результатов и их апробация.

Обзор литературы состоит из двух частей. Первая часть подробно описывает генетические и эпигенетические аспекты этапов раннего эмбрионального развития, плюрипотентное состояние и плюрипотентные клетки. Также приводится обзор данных, полученных в различных лабораториях мира в последние четыре года, по различиям в плюрипотентном состоянии ПСК человека, которое детерминируется условиями культивирования, и ставит своей целью приблизить культивируемые ПСК к плюрипотентным клеткам эмбриона.

В главе «Материалы и методы» в подробно описаны использованные протоколы молекулярно-генетических и цитогенетических подходов, а также методы культивирования и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека.

Глава «Результаты» состоит из 4-х разделов. Первые два раздела посвящены изучению эпигенетических характеристик инактивации X-хромосомы в ЭСК при культивировании в разных условиях. В 2-х оставшихся разделах приводятся данные о состоянии X-хромосомы в клетках с индуцированной плюрипотентностью, полученных в разных условиях.

С помощью современных генетических и молекулярно-биологических методов изучены эпигенетические характеристики инактивации X-хромосомы в

плюрипотентных стволовых клетках 46,XX: экспрессия гена *XIST*, запускающего процесс инактивации, распределение гистоновых модификаций на X-хромосоме, время репликации, паттерн распределения 5-гидроксиметилцитозина (5-гмЦ) – промежуточного продукта процесса активного деметилирования ДНК. Обнаружено, что линии ЭСК и ИСПК могут нести как полностью неактивную X-хромосому, так и частично активную, а также инактивированную с отсутствием классических маркеров инактивации: экспрессии гена *XIST* и триметилированного 27-го лизина гистона H3 (H3K27me3). 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. Кроме того, продемонстрировано, что степень компактизации хроматина инактивированной X-хромосомы не коррелирует с её активностью.

Вторая часть работы (глава 2 и глава 4) посвящена исследованию возможности регулировать состояние инактивированной X-хромосомы и достигать её полной реактивации, варьируя условия культивирования. Для 5-ти линий ЭСК и 3-х линий ИПСК при культивировании в условиях, необходимых для достижения состояния истинной плюрипотентности, отмечен ряд эпигенетических событий, в т.ч. частичная реактивация X-хромосомы. Впервые показано, что при частичной реактивации 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.

В главе «Обсуждение» в нескольких разделах подробно обсуждаются полученные результаты, проводится сравнение данных, полученных другими авторами, и данными, полученными А.В. Пановой.

**Научная новизна и практическая значимость исследований**

В диссертации А.В. Пановой представлены результаты, имеющие научную новизну:

- подтверждена гетерогенность эпигенетического и транскрипционного состояния X-хромосом в плюрипотентных клетках на большом количестве линий ПСК: пяти линиях ЭСК и трёх линиях ИПСК (две из которых являются изогенными, и, несмотря на это, имеют различный статус инактивации X-хромосомы);
- предложены новые эпигенетические маркеры активности X-хромосомы: 5-гидроксиметилцитозин, маркирующий районы активного деметилирования, и время репликации районов X-хромосомы. Автором обнаружено, что районы с ранней репликацией коррелируют с районами активного деметилирования и соответствуют районам с биаллельной экспрессией генов;
- отработана технология культивирования ПСК человека в условиях, приближающих клетки *in vitro* к плюрипотентным клеткам *in vivo*, что в дальнейшем может иметь практическую ценность. Впервые показано, что эпигенетическое репрограммирование ЭСК и ИПСК в этих условиях приводит к частичной реактивации X-хромосомы.

В целом, представленная диссертационная работа является законченным исследованием, а разработанный подход к определению состояния активности X-хромосомы может быть использован для характеристики линий плюрипотентных стволовых клеток, которые планируется использовать для моделирования заболеваний, в биомедицинских исследованиях, а также в области регенеративной медицины.

### **Замечания по работе**

К содержанию работы имеются замечания.

По моему мнению, имеющиеся сведения о гетерогенности культур плюрипотентных клеток по эпигенетическому и транскрипционному статусу X-хромосом, а также известные методы детекции транскрипционной активности

генов X-хромосомы стоило бы более детально рассмотреть в обзоре литературы, а не выносить упоминание о них в раздел «Обсуждение».

В разделе «Материалы и методы» нет никаких упоминаний про антитела к 5-гидроксиметилцитозину, с помощью которых получены важнейшие результаты работы. Ни разу не отмечено, какое число ядер и метафазных пластинок анализировалось в каждом эксперименте. Для большинства модификаций и состояний отмечено лишь их наличие и отсутствие в культуре, но не сообщается в каком проценте клеток они встречаются. В тех случаях, когда данные о долях признака приводятся, не указана ошибка, которую можно было бы рассчитать по формуле для дискретного биномиального распределения. В целом, по приведённым данным не складывается полная картина о гетерогенности эпигенетического и транскрипционного статуса X-хромосом внутри исследуемых культур.

На страницах 65-66 дана ссылка на рисунок 21, где, судя по описанию, должны быть представлены результаты анализа времени репликации и распределения 5-гидроксиметилцитозина, однако этот рисунок отсутствует, и на имеющемся рисунке с номером 21 приведены характеристики экспрессии OCT4 и SSEA-4 в линиях ИПСК.

В тексте диссертационной работы имеются опечатки, несогласованные предложения, непереведенные предложения на английском языке (С. 38, «Secondary antibodies were ...»), лабораторный сленг (С. 37 «С помощью широкого конца типа для пипетки ...»)

Указанные замечания не снижают значимости полученных результатов и не влияют на общую положительную оценку диссертационного исследования А.В. Пановой

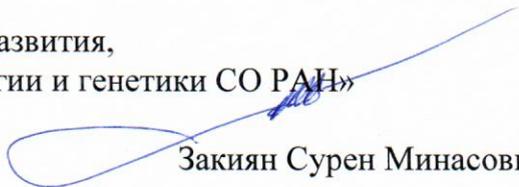
### **Общее заключение**

Основные результаты содержатся в 3 статьях, опубликованных в журналах, соответствующих Перечню ВАК России для опубликования основных научных результатов диссертации. Полученные автором данные представлены в виде

докладов на 5 международных и российских конференциях. Достоверность полученных автором результатов и сделанных на их основе выводов не оставляет сомнений. Автореферат соответствует содержанию диссертации, содержит все основные выводы и положения. Представленные в нём положения, выносимые на защиту, соответствуют выводам заключения диссертации.

Обобщая сказанное выше, следует заключить, что диссертация Пановой Александры Витальевны отвечает требованиям п.9 «Положения о присуждении учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842, а её автор заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

зав. лабораторией эпигенетики развития,  
ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН»  
д.б.н., профессор,  
е-mail: [zakian@bionet.nsc.ru](mailto:zakian@bionet.nsc.ru)

  
Закьян Сурен Минасович,

1.03.2018 г. Подпись.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр  
Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)  
Адрес: 630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева,10  
Для телеграмм: Новосибирск 90, ЦИТОЛОГИЯ  
Телефон: +7(383) 363-49-80  
Факс: +7(383) 333-12-78  
E-mail: [icg-adm@bionet.nsc.ru](mailto:icg-adm@bionet.nsc.ru)

