

УТВЕРЖДАЮ
Директор учреждения российской академии наук
Институт химической биологии и фундаментальной
медицины сибирского отделения РАН
чл. корр. Пышный Д.В.
25 марта 2018 г.



ОТЗЫВ

Ведущей организации – Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН) о научно-практической значимости диссертационной работы Пановой Александры Витальевны «Вариабельность эпигенетического состояния инактивированной X-хромосомы в женских плюрипотентных стволовых клетках человека *in vitro*», представленную в диссертационный совет Д 002.214.01 при ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика

Актуальность исследования

Диссертационное исследование Пановой А.В. посвящено исследованию инактивации X-хромосом в плюрипотентных стволовых клетках человека (ПСК). Целью исследования является изучение эпигенетического статуса инактивированной X-хромосомы, с использованием оценки наличия маркера неактивного хроматина - гистона H3K27m3, оценки представленности в ДНК гидроксиметилцитозина (5-гмЦ) как маркера активного деметилирования, экспрессии ключевого гена инактивации X-хромосомы XIST, времени репликации участков X-хромосомы, а также компактизации X-хромосомы. Действительно, статус X-хромосомы может быть принципиален в случае, когда одна из X-хромосом содержит дефектные гены. В этом случае, получение женских плюрипотентных стволовых клеток для коррекции генетических дефектов подразумевает необходимость направленной инактивации X-хромосомы или, по меньшей мере, возможности адекватной оценки ее состояния в получаемых стволовых клетках. В отличие от ПСК мыши, в которых всегда активны обе X-хромосомы, в ПСК человека наряду с одной активной X-

хромосомой может быть полностью, частично активна или полностью инактивирована вторая X-хромосома. Этот факт необходимо учитывать в случае, когда ПСК человека планируется использовать для клеточной терапии. В связи с этим изучение эпигенетического статуса X-хромосом в культурах ПСК человека и поиск надёжных маркеров, отражающих активное или инактивированное состояние X-хромосомы представляется актуальной научной и научно-прикладной задачей современной клеточной биологии и генетики. Помимо этого, нестабильность эпигенетического состояния приводит к поиску решения другой задачи данного исследования, а именно поиск способа контролировать состояние инактивации X-хромосом в ПСК. В данной работе проводится попытка реактивировать X-хромосомы путём эпигенетического репрограммирования, а именно при помощи культивирования клеток в условиях получения «наивных» клеток. Для получения «наивных» плюрипотентных ПСК человека могут быть использованы праймированные эмбриональные стволовые клетки, индуцированные ПСК или первичные клетки человека. Одним из перспективных способов получения таких клеток является использование специальных коктейлей, содержащих, в том числе, и ингибиторы сигнальных путей. Поскольку эти подходы могут быть реализованы для того, чтобы получать клетки, пригодные для клеточной терапии, исследование активности X-хромосом в таких клетках несомненно является актуальным.

Научная новизна и практическая ценность исследований

В работе впервые показано, что раннее время репликации участков X-хромосомы коррелирует с активным статусом этих участков и может являться маркером активного состояния X-хромосомы в ПСК человека. Впервые показано, что наличие в составе ДНК 5-гмЦ коррелирует с эухроматиновыми районами, участками ранней репликации и может служить маркером активного состояния X-хромосомы в ПСК человека. Показано, что степень компактизации территории X-хромосомы в интерфазном ядре не коррелирует с активностью X-хромосомы в ПСК человека. В результате исследования 5 линий эмбриональных стволовых клеток человека и 3 линий клеток человека с индуцированной плюрипотентностью показано, что эпигенетическое репрограммирование этих клеток до наивного состояния не приводит к полной реактивации X-хромосомы. Получение

«наивных» ПСК сопровождается значительными эпигенетическими изменениями X-хромосом.

В результате выполнения исследования автором получены новые данные, расширяющие представления о статусе X-хромосом ПСК человека и влиянии процессов эпигенетического репрограммирования на статус X-хромосом в ПСК человека. Полученные данные могут быть использованы для оценки статуса X-хромосомы, что может быть актуально при использовании ПСК человека для клеточной терапии заболеваний ассоциированных с X-хромосомой.

Структура диссертационной работы

Диссертационная работа Пановой А.В. написана традиционно и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 98 страницах машинописного текста и содержит 24 рисунка и 6 таблиц. Библиографический указатель содержит 87 источников.

Характеристика диссертационной работы

Во введении обосновывается актуальность диссертационного исследования, значимость и новизна. Формулируется цель и основные задачи работы; описывается предлагаемый автором подход к решению поставленных задач.

Глава 1 «Обзор литературы» подробно описывает генетические и эпигенетические аспекты этапов раннего эмбрионального развития, получение и характеристику ЭСК и ИПСК, а также ПСК в наивном состоянии. Подробно описаны этапы инактивации X-хромосомы при изучении на клетках мыши, а также обсуждены данные по инактивации X в плюрипотентных клетках человека.

Глава 2 «Материалы и методы» содержит описание использованных методов, а именно методов культивирования ПСК человека в стандартных и наивных условиях, методы пересева, заморозки, дифференцировки ПСК. Описаны молекулярно-генетические методы, использованные при выполнении работы, такие как выделение РНК и получение кДНК, ПЦР, ПЦР в реальном времени, цитогенетические методы приготовления препаратов для детекции времени репликации, гибридизация *in situ*, методы ИГХ.

Глава 3 «Результаты» состоит из 4-х разделов. Описываются результаты по изучению эпигенетических характеристик инактивации X-хромосомы в эмбриональных

стволовых клетках и при культивировании этих клеток в наивных условиях. Представлены результаты по изучению состояния X-хромосом в клетках с индуцированной плюрипотентностью в стандартных условиях и при получении в наивных индуцированных ПСК.

Автором представлены данные относительно статуса X-хромосом в эмбриональных стволовых клетках и индуцированных ПСК, культивируемых в стандартных условиях, рассмотрены подробно все признаки инактивации X-хромосомы, в том числе экспрессия гена XIST, запускающего процесс инактивации, локализация гистона H3K27m3 на X-хромосоме, время репликации, паттерн распределения 5-гмЦ – промежуточного продукта процесса активного деметилирования ДНК. Обнаружено, что вышеперечисленные клетки могут содержать как полностью неактивную X-хромосому, так и частично активную X-хромосому, а также инактивированную X-хромосому с отсутствием классических маркеров инактивации: экспрессии гена XIST и гистона H3K27me. С помощью определения времени репликации показано, что в тех клеточных линиях, где присутствует частично активная X-хромосома, неактивными остаются перичентромерный район и дистальный конец q-плеча X-хромосомы. Помимо этого, впервые показано, что время репликации и распределение 5-гмЦ могут являться хорошими маркерами активной X-хромосомы. Обнаружено, что степень компактизации хроматина X-хромосомы не коррелирует с её активностью. Разделы 2 и 4 главы «Результаты» посвящены изучению возможности активации инактивированной X-хромосомы с помощью ранее опубликованных протоколов. При помощи получения наивных стволовых клеток из 5 линий эмбриональных стволовых клеток и 3 линий индуцированных ПСК обнаружено, что индукция истинной плюрипотентности приводит к частичной реактивации X-хромосом. Впервые показано, что устойчивые к реактивации районы X-хромосом наивных ПСК, соответствуют аналогичным районам, обнаруженным в предшественниках наивных клеток. Эффективность процесса перехода клеток в «наивное» состояние зависит от используемых клеток-предшественников, получение «наивных» ПСК не приводит к полной реактивации X-хромосом.

Глава 4 «Обсуждения» написано в виде отдельной главы, в которой приведены результаты работ других авторов, выполнен сравнительный анализ данных полученных в

результате выполнения диссертационной работы и данных полученных ранее и отмеченных в мировой литературе.

В главе «**Заключении**» обобщены полученные автором результаты и акцентирована значимость полученных результатов.

В главе «**Выводы**» лаконично сформулированы выводы, отвечающие на поставленные в исследовании задачи.

Несмотря на то, что работа Пановой А.В. выполнена на высоком научном и методическом уровне, к содержанию имеются следующие замечания:

1. При описании результатов определения времени репликации не представлена статистическая обработка полученных результатов в случаях, когда культура клеток была гетерогенна по статусу X-хромосомы, не приведены данные по количеству проанализированных клеток/ядер. Эти же замечания касаются данных по определению степени компактизации территорий X-хромосом, и распределению 5-гмЦ на хромосомах в ПСК
2. В тексте встречаются неудачные фразы, предложения, начинающиеся с союза «А», действия описаны в страдательном залоге, присутствуют явные англицизмы («5-гмЦ является важной эпигенетической маркой (меткой)», стр. 60) и т.д.

В целом диссертационная работа Пановой А.В. выполнена на высоком научном и методическом уровне, предъявленные замечания никак не умаляют научной значимости проделанной работы.

Заключение

По материалам диссертации опубликовано 9 публикаций, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК России для защиты диссертаций, и 5 тезисов докладов, представленных на российских и международных конференциях. В опубликованных работах полностью отражено содержание диссертации. Автореферат диссертации полностью отражает содержание текста диссертации.

Всё вышеизложенное свидетельствует о том, что представленная к защите диссертационная работа Пановой Александры Витальевны «Вариабельность эпигенетического состояния инактивированной X-хромосомы в женских плюрипотентных стволовых клетках человека *in vitro*» является законченным научным исследованием,

представляет интерес для современной науки и соответствует квалификационным критериям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени кандидата наук, утверждённого постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика (биологические науки).

Отзыв на диссертационную работу Пановой А.В. «Вариабельность эпигенетического состояния инактивированной X-хромосомы в женских плюрипотентных стволовых клетках человека *in vitro*» рассмотрен, обсуждён и утверждён на учёном совете ИХБФМ СО РАН 2 марта 2018 года, протокол № 3. Отзыв составлен 28 февраля 2018 года зав. лабораторией молекулярной медицины ИХБФМ СО РАН, к.б.н. (специальность 03.00.04 – биохимия) Лактионовым Павлом Петровичем.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН).

Адрес: 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8;

Телефон: (383) 363-51-50; Факс: (383) 363-51-50;

Веб-сайт niboch@niboch.nsc.ru; E-mail: kms@niboch.nsc.ru, lakt@list.ru (Лактионов П.П.).

Зав. лабораторией молекулярной медицины
ИХБФМ СО РАН, к.б.н.
(специальность 03.00.04 – биохимия)

(подпись)

Лактионов Павел Петрович

Подпись заверяю:
Учёный секретарь ИХБФМ СО РАН



(подпись и печать)

Пестряков Павел Ефимович
ФИО