

## ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию на соискание учёной степени

кандидата химических наук Вирясовой Галины Михайловны

на тему: «Роль ремоделирующего хроматин белкового комплекса РВАФ в процессе миелоидной дифференцировки клеток крови человека», по специальностям 02.00.10 – биоорганическая химия (химические науки) и 03.01.03 – молекулярная биология (химические науки).

### Актуальность темы выполненной работы

Дифференцировка клеток крови — сложный и многоступенчатый процесс, нарушения в котором приводят к множеству заболеваний, в том числе к злокачественной трансформации. Важность правильного и контролируемого развития клеток крови не подлежит никакому сомнению, так как полиморфоядерные лейкоциты – один из наиглавнейших компонентов, защищающих организм от различного рода инфекций. Очевидно, что в основе процесса их дифференцировки лежит эффективная регуляция транскрипции генов, которая осуществляется в том числе ремоделирующими хроматин комплексами. Эти комплексы являются мультисубъединичными, а их состав тканеспецифичен. В работе Вирясовой Г.М. на модельной системе дифференцировки промиелоцитов в нейтрофилы изучалась роль комплекса РВАФ семейства SWI/SNF в процессе миелоидной дифференцировки клеток крови. Согласно уже известным литературным данным комплекс РВАФ необходим для развития клеток организма, включая клетки крови, что объясняет актуальность данного исследования.

### Степень обоснованности и достоверности полученных научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

В данном исследовании была проанализирована экспрессия субъединиц комплекса РВАФ, его целостность и состав, локализация, а также подробно изучена субъединица РНФ10, для которой выделяют различные изоформы в зависимости от стадии дифференцировки. Диссертационная работа Вирясовой Г.М. выявляет частные молекулярные основы общего механизма регуляции транскрипции и ремоделирования хроматина в дифференцировке клеток человека.

Обоснованность и новизна научных положений, сформулированных в диссертации Вирясовой Г.М., обусловлена адекватно поставленной целью и задачами исследования, использованием современных лабораторных методов исследования и методов компьютерной обработки, обеспечивающих статистически значимые результаты, заключение и выводы.

В ходе работы автором впервые было показано, что при дифференцировке промиелоцитов человека в нейтрофилы эффективность экспрессии генов субъединиц комплекса РВАФ, взаимодействующих с промоторами миелоидных генов, уменьшается. Также была определена роль субъединицы РНФ10 комплекса РВАФ в активации и стабилизации транскрипции специфических миелоидных генов, необходимых для развития нейтрофилов человека из клеток предшественников. РНД-содержащие изоформы субъединицы РНФ10 необходимы для активации транскрипции специфических миелоидных генов, а на более поздних стадиях они заменяются так называемыми S-изоформами, содержащих SUMO-1 конъюгирующих мотив вместо РНД-домена.

## Значимость выводов и рекомендаций, полученных в диссертации, для науки и практики

Вирясовой Г.М. была выбрана и охарактеризована модель дифференцировки клеток крови по миелоидному пути *in vitro*, состоящая из контрольных и дифференцированных клеток линии HL60 и нейтрофилов человека, подходящая для изучения роли комплексов, ремоделирующих хроматин, а также разработана и опубликована методика определения внутриклеточных (ядерных) белков методом проточной цитофлуориметрии в клетках крови и их предшественниках. Результаты работы вносят существенный вклад в понимание механизмов развития и дифференцировки клеток крови человека и, безусловно, будут учтены в дальнейших экспериментальных исследованиях клеток крови и ремоделирующих хроматин белковых комплексов.

## Содержание диссертации

Диссертационная работа Вирясовой Г.М. изложена на 123 страницах печатного текста. Диссертация содержит следующие разделы: «Оглавление», «Список сокращений», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Благодарности» и «Список литературы». Список используемой литературы составляет 113 источников, большая часть которых представляет собой статьи в ведущих международных журналах.

Во введении автор дает общую характеристику проблемы и показывает актуальность изучаемой проблемы, обосновывает цель работы. Сформулированные задачи соответствуют сути исследования. Основные положения выполненной диссертационной работы соответствуют названию работы, поставленным целям и задачам, характеризуют новизну и практическую значимость работы.

Обзор литературы содержит четыре главы. Вирясова Г.М. в первой части рассматривает данные о развитии клеток крови и свойствах нейтрофилов человека, во второй представлен обзор различных ремоделирующих хроматин комплексов. В третьей части подробно описаны комплексы семейства SWI/SNF, их основные свойства и характеристики. В четвертой части рассматривается непосредственно РВАФ комплекс: его субъединичный состав, известные на текущий момент взаимосвязи состава комплекса с патологиями и заболеваниями, включая лейкемию. Литературный обзор написан в классическом научном стиле, читается легко и свидетельствует о глубоком анализе поставленной проблемы.

В главе «Материалы и методы» автор предоставляет исчерпывающее описание использованных методов и материалов.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из 5 частей и содержит основные результаты работы. В первой части подробно рассматривается выбранная модельная система, приводятся ее основные характеристики и подтверждается применимость ее для запланированного исследования. Вторая часть посвящена изменению эффективности экспрессии генов комплекса РВАФ при дифференцировке клеток крови. В третьей части рассматривается целостность и локализация комплекса РВАФ на разных стадиях дифференцировки. В четвертой части представлены сведения об изменении в составе и количестве изоформ субъединицы РНФ10 в ходе развития клеток крови, а в пятой части методом хроматин-иммунопреципитации определена роль комплекса РВАФ и субъединицы РНФ10 в активации транскрипции генов, необходимых для дифференцировки по миелоидному пути.

Результаты экспериментов соответствуют сделанным выводам о том, что изменение состава изоформ субъединицы РНФ10 в комплексе РВАФ, которое сопровождает переход от пролиферирующих миелоидных клеток крови к нейтрофилам, представляет часть общего механизма регуляции транскрипции и ремоделирования хроматина в дифференцировке клеток человека. Особенно хочется отметить невероятно элегантные эксперименты по ко-

иммунопреципитации комплекса РВАФ, подтверждающие его целостность, и колокализации этого комплекса с активно транскрибируемыми участками генома.

#### Сведения о полноте опубликованных научных результатах

Основные положения диссертации полностью отражены в 6 печатных работах, в том числе в 3 статьях в рецензируемых международных журналах, индексируемых базами данных Scopus и WoS. Промежуточные материалы доложены на всероссийских конференциях.

#### Соответствие автореферата основным положениям диссертации

Автореферат диссертации Вирысовой Г.М. соответствует основным положениям диссертации, в нем отражены актуальность и степень разработанности темы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость и лаконично изложена основная информация, содержащаяся в тексте диссертации.

К недочетам, которые оппонент считает своим долгом отметить, относятся следующие замечания:

1. Автор выделяет значимую часть диссертации для подбора оптимальных условий дифференцировки, которые позволяют фиксировать значительные сдвиги в метаболизме, но в то же время минимизировать процент апоптотических клеток. Возникает вопрос, почему бы не отбирать неапоптотические клетки перед анализом проточной цитометрией, тем более что автор приводит такой анализ в своей работе. Возможно, внутриклеточная окраска несовместима с дальнейшим анализом, но ни в основной части, ни в материалах и методах данный вопрос не обсуждается, хотя кажется довольно логичным.
2. На рисунке 37 приведен вестерн-блоттинг, из которого автор делает вывод об относительном увеличении степени фосфорилирования ДНК-зависимой РНК-полимеразы II при дифференцировке клеток линии HL60, который вынесен в основные выводы диссертационной работы. В данном случае автору необходимо было привести данные количественного обсчета, которые бы подтверждали эту сентенцию, так как субъективный визуальный анализ не приводит к указанному утверждению в полной мере.
3. Данные на рисунке 38, описывающие привлечение комплекса РВАФ на промоторы CD66 и p21 показали оппоненту не столь убедительными. Увеличение количества мРНК, кодирующей CD66 и p21, представленное на рисунке 39, составляет десятки и даже сотни раз. Относительный уровень преципитации субъединиц комплекса РВАФ увеличивается на десятки процентов, в лучшем случае в разы. В этой связи у оппонента возникает целый ряд вопросов. Можно ли связывать подобный взрывной рост количества мРНК исключительно с таким сравнительно незначительным рекрутированием комплекса РВАФ? Степень увеличения количества мРНК не коррелирует со степенью привлечения РВАФ на соответствующие промоторы. Еще один вопрос связан с непропорциональным ростом отдельных субъединиц комплекса РВАФ, привлекаемых на отдельные промоторы, (от десятков процентов до нескольких раз), что не сходится с концепцией целостности комплекса.

К минорным замечаниям можно отнести следующие

4. Фраза «Ремоделирующие хроматин комплексы белков способны перемещать октамеры гистонов вдоль молекулы ДНК или на *соседние молекулы*». Не совсем очевидно, что подразумевается под соседними молекулами.
5. Незначительное количество повторений в литобзоре. Например, автор где-то 5-6 раз настаивает, что бромодомены все-таки необходимы для связывания ацетилированных гистонов.
6. Подпись к рисункам 8, 9 и 10 выполнена в крайне лапидарной форме, решительно не расшифрован функционал доменов, что принуждает читателя искать пояснения в тексте.
7. Общепринятым является использование маленькой буквы р в обозначении белка р21.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспортам специальности 02.00.10 – «биоорганическая химия» (по химическим наукам) и специальности 03.01.03 – «молекулярная биология» (по химическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Вирясова Галина Михайловна безусловно заслуживает присуждения учёной степени кандидата химических наук по специальностям 02.00.10 – «биоорганическая химия» (химические науки) и 03.01.03 – «молекулярная биология» (химические науки).

Официальный оппонент:

доктор химических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией белков гормональной регуляции, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

БЕЛОГУРОВ Алексей Анатольевич

05.12.2019

Адрес места работы: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук  
Тел.: (495) 7273860; e-mail: belogurov@mx.ibch.ru

Подпись Белогурова А.А. заверяю  
Ученый секретарь ИБХ РАН  
доктор физ.-мат.наук



Олейников В.А.