

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию на соискание ученой степени кандидата химических наук

Вирясовой Галины Михайловны на тему: «Роль ремоделирующего хроматин 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 и практическая значимость выбранной темы. Нейтрофилы представляют собой одну из группы клеток крови, участвующих в иммунном ответе. Они развиваются из гематопоэтических стволовых клеток по миелоидному пути. Процесс дифференцировки регулируется изменениями в экспрессии множества генов, обеспечивающих, с одной стороны, выход из пролиферативного цикла, а с другой — приобретение клетками их свойств. Нарушения в процессах дифференцировки приводят к возникновению серьезных заболеваний, и наиболее известным примером является миелобластная лейкемия. Важную роль в регуляции экспрессии генов играют ремоделирующие хроматин комплексы. Работа Вирясовой Г.М. направлена на изучение роли одного из таких комплексов - РВАФ, относящегося к семейству SWI/SNF, в процессе миелоидной дифференцировки клеток крови.

Следует подчеркнуть важность исследования роли ремоделирующих хроматин комплексов в развитии организма. Примером тому являются литературные данные, свидетельствующие о влиянии модификации субъединиц комплексов и нарушений уровней экспрессии их генов на ход дифференцировки.

Диссертационная работа Вирясовой Г.М. является закономерным и актуальным продолжением масштабных исследований ремоделирующего комплекса РВАФ, но при этом имеет большую научную новизну: в клетках крови данный комплекс изучался мало. В комплексном исследовании, выполненном диссертантом, на экспериментальной модели дифференцировки промиелоцитов человека в нейтрофилы впервые было показано, что эффективность экспрессии генов субъединиц комплекса РВАФ, взаимодействующих с промоторами миелоидных генов, уменьшается при дифференцировке. Достаточно подробно была изучена субъединица PHF10, имеющая четыре изоформы. Было обнаружено, что изоформы субъединицы PHF10, содержащие PHD-домен (P-изоформы), заменяются на более короткую Ss-изоформу, в которой отсутствует домен PHD. В диссертационной работе Вирясовой Г.М. показано, что комплекс РВАФ привлекается на промоторы специфических миелоидных генов белков семейства CD66 и гена белка p21, отвечающего за выход клеток из

клеточного цикла, в процессе активации их транскрипции. При этом Р-изоформы субъединицы PNF10, входящей в состав комплекса на первых стадия дифференцировки, необходимы для начала активной транскрипции специфических миелоидных генов, тогда как Ss-изоформы преобладают в клетках, уже находящихся в терминальных стадиях развития. Это открытие, сделанное Вирясовой Г.М., представляет большой интерес, поскольку позволяет глубже понять взаимосвязь между составом ремоделирующего комплекса PBAF и развитием клеток крови. Актуальность и научная новизна полученных данных не вызывают сомнений.

Исследование выполнено на высоком уровне с помощью современных методов биохимии, молекулярной и клеточной биологии, и вносит существенный вклад в понимание механизмов дифференцировки клеток крови человека. Эти данные чрезвычайно важны с точки зрения изучения молекулярных механизмов таких заболеваний, как острая промиелоцитарная лейкемия.

Структура диссертации. Диссертация построена по традиционному плану и содержит следующие разделы: Введение, в котором сформулированы задачи исследования, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 123 страницах, включает 41 рисунок и 6 таблиц, список цитируемой литературы состоит из 113 наименований. Материал диссертации изложен достаточно подробно и логично, все разделы являются необходимыми компонентами единой структуры диссертации, все основные результаты исчерпывающе представлены в виде таблиц и рисунков.

Представленный в диссертации Вирясовой Г.М. литературный обзор интересен не только в плане знакомства с предметом исследования данной работы, но также дает достаточно подробную информацию современного состояния знаний о нейтрофилах человека (раздел 1), устройстве хроматина (раздел 2), ремоделирующих хроматин комплексах в целом (раздел 3) и комплексах семейства SWI/SNF, включая PBAF-комплекс, в частности (раздел 4).

В главе «Материалы и методы» подробно описаны используемые в работе методики. Методика цитофлуориметрического анализа и сравнения количества внутриклеточных белков в клетках линии HL60 и выделенных из крови доноров нейтрофилов человека, использованная для изучения экспрессии генов субъединиц комплекса PBAF, была также опубликована в рецензируемом международном журнале.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из пяти разделов, в которых изложено решение поставленных задач. В первом разделе охарактеризована выбранная экспериментальная модель: проанализировано появление специфических миелоидных маркеров, выход клеток в ходе дифференцировки из пролиферативного цикла, изменение морфологии ядра и апоптоз. Во втором разделе проанализированы количественные изменения комплекса РВАФ при переходе от промиелоцитов (клеточная линия HL60) к дифференцированным нейтрофилам: экспрессия генов субъединиц снижается как на уровне мРНК, так и на уровне белка. Целостность комплекса и ко-локализация с активно транскрибирующей РНК-полимеразой II показана в третьем разделе обсуждения результатов. Четвертый раздел посвящен субъединице РНФ10 комплекса РВАФ. В работе Вирясовой Г.М. установлено, что в нейтрофилах преобладают Ss-изоформы субъединицы РНФ10, а в предшественниках (на примере клеток HL60) преобладают изоформы с РНД-доменами. В заключительной части Результаты и обсуждения исследована роль комплекса РВАФ в активации специфических генов при дифференцировке клеток крови: показано, что субъединицы комплекса привлекаются на промоторы генов поверхностных белков семейства CD66 и ингибитора циклин-зависимых киназ p21, а также отдельно изучено взаимодействие изоформ субъединицы РНФ10 с промоторами этих генов.

В разделе «Заключение» суммируются полученные данные, обсуждается роль ремоделирующего хроматин комплекса РВАФ в развитии клеток крови по миелоидному пути на основании полученных экспериментальных данных, а также сравнивается с общемировыми исследованиями.

Диссертационная работа Вирясовой Г.М. выполнена на очень высоком научном уровне, тщательно продумана и детально описана. Достоверность результатов не вызывает никаких сомнений. Выводы работы полностью соответствуют полученным результатам, автореферат и публикации отражают основное содержание диссертации.

По существу работы замечаний не имеется. Можно высказать лишь несколько технических замечаний/комментариев. Большая их часть касается раздела "Материалы и методы". Так, при описании коммерчески-доступных антител желательно указывать каталожный номер, так как часто производитель предлагает больше одного варианта антител к желаемому белку. Кроме того, в описании коктейля ингибиторов протеаз (стр 47) желательно было бы указать его название, так как производятся как полные, так и лишенные хелаторов "коктейли". Более того, не очень корректно приводить их рабочую концентрацию в процентах, так как используются не чистые вещества, а как правило раствор в DMSO (по крайней мере, в случаях предлагаемых компанией Sigma). В подразделе "Буферные растворы" неверно указан

состав 1-кратного ТАЕ: "1 М Трис, 50 мМ ЭДТА". На странице 50 неверно посчитана концентрация бикарбоната в питательной среде (сказано, что использовали "2 г/л, 2 мМ), а 2 г/л соответствуют 16,8 мМ концентрации.

Так, на рисунке 5, показывающем схему синтеза транс-ретиноевой кислоты в организме, было бы крайне интересно увидеть названия катализирующих реакции ферментов (хотя это не являлось объектом диссертационной работы). В тексте есть несколько не очень удачных формулировок и опечаток: напр., мутации в столовых клетках" на стр. 28 (вместо "мутации в геноме стволовых клеток) и ""Trls-HCl" (вместо "Tris-HCl") на стр. 49. Но опять же, их число незначительно, и они не мешают воспринимать суть работы. В некоторых местах β -актин указан как b-актин. Но опять же, это является скорее придиркой к хорошей работе. Имеется вопрос к утверждению на странице стр 28 о том, что одна из субъединиц хроматин-ремоделирующего комплекса обладает АТФазной активностью. Известно ли, действительно ли она обладает специфичностью в отношении данного нуклеозидтрифосфата?

Наконец, к разделу "результаты и обсуждение" можно задать один вопрос про экспрессию субъединицы PBAF комплекса - BAF180: на рисунке 25 не видно уменьшения уровня транскрипции ее гена в клетках HL60, обработанных ретиноевой кислотой, тогда как в заключении подраздела утверждается о том, что снижается экспрессия всех субъединиц комплекса. Я понимаю, что вывод сделан исходя из резко сниженной экспрессии этой субъединицы в первичных нейтрофилах. Но исследовали ли экспрессию этой субъединицы другими методами (напр., проточной цитометрии или вестерн-блоттинга, как показано на рисунках 26-29 для других белков?

Вместе с тем, указанные замечания не влияют на суть и не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальностей 02.00.10 - «биоорганическая химия» (по химическим наукам) и 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 заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальностям 02.00.10 -

«биоорганическая химия» (химические науки) и 03.01.03 – «молекулярная биология»
(химические науки)

Официальный оппонент:

кандидат химических наук,

ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

ИВАНОВ Александр Владимирович

Подпись

05.12.2019

Адрес места работы:

119991, г. Москва, ГСП-1, ул. Вавилова, д.32

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии
имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Тел.: +7 (495) 422-15-54 e-mail: aivanov@eimb.ru

*Подпись Иванова А.В. удостоверение
учёной комиссии Высшей РАН
Бочаров А.А.*

