

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).

В последние годы множество исследований посвящено изучению ремоделирующих хроматин комплексов, необходимых для регуляции транскрипции генов. Изучаемый в данной работе комплекс РВАФ относится к семейству SWI/SNF и необходим для развития клеток организма, в том числе для дифференцировки клеток крови, в том числе для дифференцировки нейтрофилов – продуктов дифференцировки по миелоидному пути. Изменения в составе комплекса РВАФ нередко приводят к возникновению серьезных патологий, включая онкологические заболевания.

Диссертационная работа Вирясовой Галины Михайловны является актуальным и оригинальным исследованием механизмов участия ремоделирующего комплекса РВАФ и его субъединиц в развитии клеток крови человека.

Основные положения, сформулированные в диссертации Вирясовой Г.М., обоснованы и соответствуют поставленным целям и задачам исследований, получены с использованием современных методов исследований и анализа.

Как и актуальность исследования, научная новизна работы не вызывает никаких сомнений. Несмотря на то, что ремоделирующие хроматин комплексы изучаются достаточно активно, в клетках крови проведено всего несколько исследований, что обуславливается, в том числе, сложностью работы с первичными культурами клеток. Было известно, что РВАФ комплекс необходим для развития клеток крови. В работе Галины Михайловны показано, что комплекс РВАФ выступает как регулятор транскрипции генов общих белков клеточного цикла и специфичных для миелоидной дифференцировки. Для того, чтобы клетка-предшественник могла выйти из клеточного цикла и начать дифференцировку, хроматин должен быть ремоделирован таким образом, чтобы сделать доступными гены, задействованные в дифференцировке и необходимые для функционирования нейтрофилов. С другой стороны, в зрелых нейтрофилах активного ремоделирования хроматина уже не происходит, транскрипция специфичных генов поддерживается на стабильном уровне. Вирясовой Г.М. было обнаружено, что это обеспечивается изменением изоформ субъединицы RNF10 ремоделирующего хроматин комплекса РВАФ. RHD-содержащие изоформы субъединицы RNF10 необходимы для активации транскрипции специфических миелоидных генов, а на более поздних стадиях они заменяются так называемым S-изоформами, содержащих SUMO-1 конъюгирующих мотив вместо RHD-домена.

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».

Обзор литературы содержит четыре главы. Первая часть посвящена развитию клеток крови и нейтрофилам человека. Во второй части обсуждаются основные свойства хроматина и виды ремоделирующих хроматин комплексов. Третья часть обзора литературы посвящена комплексам семейства SWI/SNF, их составу и механизму ремоделирования нуклеосом. Четвертая, заключительная часть обзора литературы, содержит известные на данный момент факты о ремоделирующем хроматин комплексе РВАФ, входящем в состав семейства SWI/SNF, его роли в развитии организма, а также особенностях его субъединиц.

Глава «Материалы и методы» описывает методологию экспериментов, сделанных в рамках исследования. Все методы изложены очень обстоятельно и аккуратно.

Раздел «Результаты и обсуждение» содержит основные результаты работы. Исследование Вирясовой Г.М. выполнено на высоком уровне с использованием современных методов биохимии, молекулярной и клеточной биологии. Результаты экспериментов соответствуют сделанным выводам о том, что изменение состава изоформ субъединицы PNF10 в комплексе PBAF, которое сопровождается переходом от пролиферирующих миелоидных клеток крови к нейтрофилам, представляет часть общего механизма регуляции транскрипции и ремоделирования хроматина в дифференцировке клеток человека.

Текст сопровождается 113 ссылками, большая часть которых относится к работам последнего десятилетия.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, а результаты диссертационной работы опубликованы в научных статьях в зарубежных журналах (*Biochimica et Biophysica Acta*, *Cells*, *MethodsX*) и представлены в виде докладов на конференциях.

Тем не менее, работа не лишена недостатков.

1. Так, в обзоре литературы часть про дифференцировку клеток крови и функции нейтрофилов написана несколько «по-школьному». Но это же не научно-популярная литература, а диссертация. Рисунок кроветворения из обзора Афанасьева и соавторов (Рис.1), к тому же опубликованный 8 лет назад, рассчитан на общий курс цитологии и слишком схематичен для диссертации.
2. При описании свойств нейтрофилов, опять же, используется упрощенное описательное изложение материала, молекулярная составляющая этой части обзора мала, и, кроме того, нет обсуждения самого удивительного свойства нейтрофилов – способности к нетозу, а именно при нем стремительно меняется организация хроматина, и в этом контексте хотя бы должно было быть упомянуто.
3. Экспериментальная часть:
 - 3.1. Клетки HL60, возможно, и были получены диссертантом из Российского банка клеточных культур, но до этого момента они были получены Галахером (Gallagher) и др. в 1976 году и депонированы в ATCC (American Tissue Culture Collection). Путь в Россию этих клеток, скорее всего, долог и извилист, но на авторов линии точно нужно было сослаться.
 - 3.2. При дифференцировке линии HL60 использовалась только транс-ретиноевая кислота, хотя другие агенты, например PMA или DMSO, или совместное использование всех этих агентов, возможно, были бы более успешными. При анализе FACS на CD66 почему-то на одну гистограмму (Рис.17) помещены результаты и HL-60, и нейтрофилов человека (в случае последних без изотип-контроля?). Кроме того, 500 клеток для анализа, тем более, клеточной культуры – катастрофически мало. Следует отметить, что в целом представление автором результатов цитофлуориметрии далеко от общепринятого.
 - 3.3. Совсем непонятно, для чего такое длинное описание изучения клеточного цикла, да еще и разными способами. Автор - не первый исследователь, использующий дифференцировку HL60, описание слишком длинное, да и логическая связка со следующими частями исследования в диссертации не приведена.
 - 3.4. Микроскопические фотографии точно не представляют собой стократное увеличение. Увеличение не равно цифре, написанной на объективе микроскопа.

Конечно, диссертация защищается по специальностям «биоорганическая химия» и «молекулярная биология», но, как мне представляется, еще на стадии написания ее надо было показать кому-либо из коллег – гематологов. Тогда не было бы оплошностей и шероховатостей, которые вызывают чувство недоумения, так как в целом работа хорошая, автор безусловно проделал большую работу и получил значимые результаты.

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 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 биологических наук, профессор РАН, член-корреспондент РАН,
руководитель лаборатории клеточной биологии,
Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального
медико-биологического агентства
Лагарькова Мария Андреевна

05.12.2019

Адрес места работы: 119435, г. Москва, ул. Малая Пироговская, д. 1а. Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства

Тел.: (499) 246-4900; e-mail: lagar@rcpcm.org

Подпись Лагарьковой М.А. заверяю

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА

к.б.н. Кострюкова Е.С.

