

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук Вьюшкова Владимира Сергеевича на тему: «Влияние когезина на пространственную динамику интактного и поврежденного хроматина» по специальности 1.5.3. Молекулярная биология

Диссертация Вьюшкова В.С. посвящена изучению роли когезина в регуляции динамики хроматина в ядре клеток человека. Когезин известен как ключевой архитектурный белок, участвующий в регуляции активности генов, а также в формировании структуры хромосом. В последнее время когезин и родственные ему SMC привлекают значительное внимание исследователей так, как было показано, что они осуществляют свою функцию благодаря механизму активной экструзии хроматиновых петель. Именно благодаря экструзии петель формируются топологические домены хроматина обеспечивающие правильный паттерн взаимодействия генов с отдаленными энхансерами. Однако данная область 3D геномики базируется в основном на методах, фиксирующих статичную моментальную структуру хроматина, тогда как сама суть механизма протягивания петель хроматина является динамичной, петля растет со временем и этот процесс не может происходить без изменения взаимного положения участков хроматиновой нити. Сложность прижизненной визуализации динамики отдельных геномных локусов объясняет почему до сих пор влияние когезина на локальную динамику отдельных хроматина, особенно в контексте повреждений ДНК, остается малоизученным.

Актуальность темы не вызывает сомнений, так как понимание механизмов, контролирующих динамику хроматина, напрямую связано с вопросами контроля активности генов развития, в том числе генов онкогенов; поддержания стабильности генома, за счет контроля подвижности концов ДНК при репарации повреждений генома; контроля формирования хромосомных aberrаций, за счет поддержания правильной структуры митотических хромосом. Полученные в работе уникальные оценки динамики

геномных локусов на масштабах от 1 секунды до 1 минуты закладывают фундамент для построения биофизических моделей хроматина. Работа выполнена с использованием современных методов редактирования генома, визуализации (CRISPR-Sirius) и анализа данных, что соответствует передовому уровню мировой науки.

Научная новизна работы заключается в том, что автором впервые на клетках человека показано, что когезин выступает ограничителем локальной подвижности хроматина на малых масштабах времени (менее минуты). Особую ценность представляет дифференцированный анализ эффекта деплеции когезина до и после репликации ДНК, так как такие оценки позволяют вычлнить вклад канонической функции когезина - когезии сестринских хроматид - в суммарной динамике хроматина. Также подчеркнута ценность и новизну экспериментов по оценке динамики хроматина в составе специализированных структур — фокусов репарации двунитевых разрывов. Описанные в работе результаты являются одними из первых в мире оценок динамики хроматина на масштабе менее минуты.

Практическая значимость работы обусловлена созданием новой клеточной модели (HCT116 с системой AID, CRISPR-Sirius и репортером FusionRed-BP1-2), которая может быть использована для дальнейших исследований динамики хроматина, а также для скрининга препаратов влияющих на репарацию повреждений ДНК. Полученные данные о том, что когезин не влияет на подвижность уже сформировавшихся репарационных фокусов, важны для понимания причин геномной нестабильности в опухолевых клетках с мутациями в генах когезина.

Анализ содержания работы

Диссертация построена по классическому принципу и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение,

заключение и выводы. Работа изложена на 210 страницах, хорошо иллюстрирована.

Во «Введении» сформулированы цель и задачи исследования, обоснована актуальность. «Обзор литературы» объемный, но не избыточный, в нем нет лишних разделов. Вся приведенная информация хорошо соотносится с экспериментальной частью работы. Обзор литературы написан очень хорошо. Он демонстрирует глубокое понимание автором современных проблем биологии хроматина. Отдельного внимания заслуживает последовательное и логичное изложение материала: от структуры нуклеосомы через модели компартментализации и петлевой экструзии к функциям когезина и методам визуализации структур хроматина.

Для обзора литературы и для всей диссертации характерны точные и продуманные определения и формулировки. Например, при описании гомологичной рекомбинации отдельно уточняется, что термин гомологичная в данной области не несет эволюционной нагрузки. «Направляемая гомологией репарация не является строго определённым путем, а представляет собой группу нескольких возможных путей, так или иначе опирающихся на использование похожих, и именно в этом смысле гомологичных, последовательностей». На мой взгляд, такая терминологическая строгость характеризует высокую квалификацию Владимира Сергеевича.

Раздел «Материалы и методы» описан с исключительной детализацией, что обеспечивает возможность воспроизвести эксперименты при необходимости, а также помогает оценить достоверность описанных в диссертации результатов. Автор владеет широким арсеналом методик: от классического молекулярного клонирования до биоинформатического анализа данных ChIP-Seq и написания скриптов на Python для обработки изображений.

В главе «Результаты» представлен большой объем экспериментальных данных. Логика изложения результатов исследования выстроена четко. Сначала описывается создание и валидация ключевого инструмента исследования — клеточной линии с индуцируемой деградацией RAD21. Автор не только подтверждает деплецию RAD21 методом вестерн-блоттинг, но и тщательно характеризует полученные клоны, отмечая блок клеточного цикла, митотические дефекты, нарушения формы ядер после деплеции RAD21. Все эти наблюдения свидетельствуют о потере функции когезина, что дополнительно подтверждает валидность созданной клеточной линии как инструмента для исследований роли когезина.

Адаптация системы CRISPR-Sirius. Здесь важно отметить методическое сравнение двух версий системы (MS2/MCP и PP7/PCP), позволившее выбрать оптимальный вариант для дальнейшей работы. Эта часть работы безусловно является важным методическим этапом для конкретно этого исследования. Однако на мой взгляд, сравнение двух версий системы визуализации локусов хроматина CRISPR-Sirius слишком частный результат, чтобы выносить его в положения на защиту.

Анализ подвижности локусов. Полученные MSD-кривые и рассчитанные параметры (коэффициент диффузии, показатель α) убедительно доказывают, что деплеция когезина увеличивает подвижность хроматина на масштабах от секунд до минут. Продуманная система контролей заслуживает особой похвалы. Например, сравнение подвижности в живых и фиксированных клетках (Рисунок 55А) однозначно доказывает, что наблюдаемая динамика — не артефакт съемки или обработки изображений.

Дифференциальный анализ в разных фазах клеточного цикла. Предложенный автором остроумный и нетравматичный способ накопления клеток в G1/G0 за счет длительного культивирования (5 дней) позволил отдельно изучить эффекты когезина до и после репликации, что является сильной стороной работы.

Анализ динамики фокусов репарации. Несмотря на отсутствие эффекта деплеции когезина, этот результат важен и неожидан. Он ставит новые вопросы о механизмах стабилизации поврежденной ДНК.

В разделе «Обсуждение», на мой взгляд, автор корректно сопоставляет свои данные с немногочисленными существующими литературными источниками (Mach et al., Cheblal et al.), объясняет возможные причины различий (разное временное разрешение, природа визуализируемых объектов) и взвешенно указывает на ограничения исследования.

Хочется отметить, что диссертационная работа Владимира Сергеевича отлично построена с точки зрения постановки актуальной научной задачи, продуманного дизайна экспериментов с необходимыми контролями. Диссертация очень хорошо написана и оформлена. Мне не удалось заметить в тексте нарушений логики, опечаток или несогласованных предложений. Я искренне считаю, что это одна из лучших диссертаций которые мне довелось читать.

При общей очень высокой оценке работы у меня возник несколько вопросов и комментариев, преимущественно дискуссионного характера.

1. На мой взгляд первые два вывода и первые два положения, выносимые на защиту, являются техническими и сильно уступают по научной значимости остальным выводам и положениям. Поэтому мне кажется, что автору стоило ограничиться только выводами, касающимися оценок динамики хроматина.
2. Для исследования динамики хроматина в клетках до репликации ДНК в работе предложено использовать метод синхронизации клеток в G1/G0 за счет длительного (5 дней) культивирования. Отмечается, что при

таком методе синхронизация достигается, по-видимому, за счет контактного торможения при достижении высокой плотности культивирования клеток. Однако остается не до конца ясным, как такой подход сказывается на эффективности деплеции когезина? Проверяться ли деградация RAD21 в G1/G0 клетках на момент съемки? Не снижается ли эффективность AID-системы в клетках, в таких условиях?

3. Интуитивно понятно, что подвижность локусов хроматина должна уменьшаться с увеличением объема локуса. Проводились ли попытки оценить объем фокусов репарации двунитевых разрывов ДНК, визуализированных с помощью белка FusionRed-BP1-2? Мне кажется было бы справедливо как-то отразить в выводах, тот факт, что подвижность нативного хроматина оценивалась на гораздо меньшем пространственном масштабе, чем подвижность гораздо больших объемов хроматина в районе разрыва ДНК.

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 специальности 1.5.3. Молекулярная биология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова. Диссертационное исследование оформлено согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Вьюшков Владимир Сергеевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Официальный оппонент:

кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории генетики развития
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Баттулин Нариман Рашитович

12 марта 2026

Контактные данные:

тел.: _____, e-mail: battulin@bionet.nsc.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.02.07 – Генетика

Адрес места работы:

630090, Новосибирск, Россия, пр.ак. Лаврентьева, 10

ИЦиГ СО РАН

Тел.: _____); e-mail: icg-adm@bionet.nsc.ru

Подпись к.б.н., в.н.с. ИЦиГ СО РАН И.Р. Баттулина
удостоверяю

ученый секретарь ИЦиГ СО РАН к.б.н.

Г.В. Орлова

12 марта 2026