

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

Актуальность работы

Работа Вьюшкова В.С. посвящена исследованию роли когезинового комплекса в динамике хроматина в клетках человека. Данная область безусловно является одной из наиболее активно развивающихся областей молекулярной биологии в настоящее время. С того момента, как было показано, что когезиновый комплекс способен не только осуществлять когезию сестринских хроматид, но и обеспечивать дальние структурные взаимодействия в геноме, влияя на паттерн экспрессии генов, стало понятно, что данный комплекс является одним из путей контроля работы генома. С этого момента когезиновый комплекс стал популярной мишенью для исследователей. Стоит отметить, что лучше всего роль когезинового комплекса в формировании пространственной структуры генома охарактеризована методами C-технологий (3C, Hi-C и т.д.). Однако, данные методы практически не дают возможности исследовать особенностей структуры хроматина в отдельных клетках, а обычно представляют усредненную картину по клеточной популяции. И, разумеется, C-методы не способны показать динамику изменения структуры генома не только в малом (миллисекундном), но и в среднем диапазоне (секунды – минуты). В связи с данными недостатками является очень актуальным исследование структуры и динамики хроматина микроскопическими методами. Широкий спектр существующих и разрабатываемых подходов к маркированию индивидуальных локусов в геноме хорошо иллюстрирует востребованность подобных методов исследования.

В этой связи работа Вьюшкова В.С., посвященная разработке системы для исследования динамики локусов в клетках человека на фоне деплеции субъединицы когезина, является актуальной и будет востребована научным сообществом.

Новизна и практическая значимость

В представленной работе впервые было показано, как меняется динамика локуса гена *TMEM242* в клетках HCT116 (карциномы толстой кишки) на фоне быстрой деплеции субъединицы когезинового комплекса RAD21 путем ауксин-зависимой деградации. Представленные результаты обладают безусловной научной ценностью с точки зрения разработки и апробации экспериментальной модельной системы для исследований динамики хроматина локусов-мишеней в индивидуальных клетках. Автором были приложены значительные усилия для создания сложной, многосоставной экспериментальной модели. Представляется, что указанная модель может быть с успехом использована в дальнейшем для изучения динамики различных областей генома человека на фоне деплеции когезинового комплекса. В частности, данная модель может представлять интерес для тестирования потенциальных лекарственных препаратов, направленных на ограничение или стимуляцию работы когезинового комплекса с целью управления структурой хроматина клетки.

В качестве ценного экспериментального материала также можно считать созданный автором набор генетических конструкций для внедрения ауксин-зависимого дегрона в ген *Rad21*, а также системы визуализации CRISPR-Sirius. Данный набор конструкций может быть применен для создания экспериментальных моделей, подобных созданной автором, в других культивируемых клетках человека.

Новизна работы подтверждена публикациями в международных научных журналах. В опубликованных работах автор занимает лидирующие

позиции в списке авторов, что свидетельствует о его ведущей роли в выполнении представленных работ.

Структура и основное содержание работы

Диссертация содержит оглавление, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, заключение, список литературы и приложения. Диссертация представлена на 210 страницах, имеет 63 рисунка и 3 таблицы. Работа построена последовательно и логично. Во «введении» автор формулирует актуальность темы, ставит цель и задачи исследования, описывает теоретическую и практическую значимость работы. «Обзор литературы» написан достаточно детально. Автор представляет фундаментальную информацию относительно белков, вовлеченных в организацию структуры хроматина. В силу того, что представленная работа имеет большую методическую ценность, можно было бы часть обзора литературы посвятить описанию именно методов исследования структуры хроматина, примененных в работе. Например, собрать информацию о методе CRISPR-Sirius и обсудить ее детально. Также более детально в литературном обзоре можно было бы обсудить источники, в которых осуществлялась деплеция Rad21 и описывалось ее влияние на геном и работу генов.

Раздел «материалы и методы» содержит детальное описание методов, примененных автором в работе. Описание дает возможность воспроизвести представленные методы. Стоит отметить, что примененные автором подходы полностью соответствуют современному уровню развития молекулярной биологии.

Раздел «результаты» написан последовательно и детально. Он содержит информацию не только об экспериментах, которые завершились успешно, но также и об экспериментах, которые не привели к получению ожидаемых

научных результатов. Данный раздел позволяет оценить обширный объем экспериментальной работы, проделанной автором.

В разделе «обсуждение» автор еще раз суммирует описанные результаты и старается соотнести их с ранее опубликованными данными о воздействии деплеции когезина на динамику хроматина. Также в данном разделе автор указывает на перспективные направления дальнейших исследований.

Обоснованность и достоверность выводов

Обоснованность сделанных автором выводов не вызывает сомнений. Автор использовал набор самых современных методов молекулярной биологии, включая ауксин-зависимую деградацию таргетного белка и методику визуализации геномных локусов CRISPR-Sirius. Представленные результаты подтверждены необходимым набором контрольных экспериментов. Формулировка выводов логична и полностью основана на полученных экспериментальных данных.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. В нем представлены вся необходимая информация о цели, задачах, актуальности и теоретической и практической значимости. Положения, выносимые на защиту, отвечают поставленным задачам.

Замечания

Основные замечания к работе:

1. Для визуализации положения геномного локуса в работе используется система CRISPR-Sirius. Однако, в исходном описании данной системы, как и в других работах, использующих данную систему, применяется двухцветный подход к мечению локусов (на основе PP7/PCP и MS2/MCP белков и шпилек). Мечение одновременно двух локусов дает возможность исследовать не только индивидуальную, но взаимную динамику локусов в

геноме. Почему в созданной экспериментальной системе был выбран только один тип мечения?

2. Область исследования влияния деплеции Rad21 на структуру хроматина является очень «горячий». Существует много публикаций, в которых были проведены исследования, очень близкие по экспериментальному плану. В данной диссертации не хватает совсем точного контекста для понимания места проведенного исследования в существующей литературе. Было бы уместно соотнести полученные данные с данными других источников о влиянии деплеции Rad21 на динамику хроматина в линии HCT116 и выделить совпадающие и различающиеся моменты (например, используя источники [10.1038/s41467-022-29343-z](https://doi.org/10.1038/s41467-022-29343-z); [10.1038/s41588-025-02406-9](https://doi.org/10.1038/s41588-025-02406-9); [10.1126/sciadv.adp0855](https://doi.org/10.1126/sciadv.adp0855) и другие).
3. Так как экспериментальная модельная система достаточно сложная и была получена автором в несколько этапов, в разделе «материалы и методы» была бы уместна общая схема проведенных экспериментов. В исследовании неоднократно проводилась селекция клеток на фоне добавления антибиотиков и не совсем понятно, в какой последовательности и на каких антибиотиках проводилась селекция. Также не на всех этапах было указано, как проводился отбор клеток при трансдукции без использования антибиотиков (например, при интеграции MCP-GFP и PP7-GFP белков). Общая схема, иллюстрирующая проведенные работы помогла бы лучше разобраться в данных.
4. Деграция Rad21 при помощи ауксин-зависимого дегрона является хорошим инструментом для быстрой деплеции. Однако, воздействие на клетку в течение 6 часов для деграции не дает возможность полностью исключить наличия косвенных эффектов. Одним из источников косвенных

эффектов является изменение транскрипции генов. Было ли ранее описано, как быстрая деплеция Rad21 влияет на транскрипцию генов? Как вы оцениваете это влияние на ваши результаты?

Минорные замечания:

1. В тексте неоднократно встречается, что динамика хроматина была исследована на малых масштабах времени. Скорее, исследование велось на средних временных масштабах. Так, например, MinFLUX позволяет исследовать динамику в миллисекундном диапазоне (10.1101/2025.05.10.653248).
2. В разделе «материалы и методы» не хватает схемы интеграции дегрона в геном (включающей в себя полный ген Rad21).
3. Для сравнения эффективности систем детекции локусов при помощи PP7 и MS2 шпилек было бы хорошо дополнить диссертацию материалами об уровне экспрессии MCP-GFP и PCP-GFP белков, а также уровнях экспрессии шпилек gRNA-PP7, gRNA-MS2. Также хорошо было бы представить информацию об эффективности трансдукции конструкциями, несущими шпильки. Была ли замечена разница в экспрессии белков PP7 и MS2 в других работах (в тех же или других клетках)?
4. Для того, чтобы проводить количественную оценку по вестерн-блотингу в рисунке 38 В необходимо наличие хотя бы нескольких точек разведения сигнала на том же самом блоте (сравнение с другим блотом не применяется). К сожалению, сигнал на вестерн-блоте может уменьшаться нелинейно (что видно на Рисунке 39).
5. В ходе исследования уровня связывания Rad21 с хроматином, представленного на Рисунке 43, не понятна была ли использована исходная фракция хроматина (input) при обработке сигнала. Так как обычно, в ходе такого анализа используется обсчет уровня сигнала в отобранных пиках, то

использование инпута является важным (позволяет более качественно отобрать реальные пики белка в сайтах связывания). Вероятно, именно с методом отбора пиков связано относительно слабое снижение сигнала связывания в образце, обработанном ауксином, на усредненных графиках. Было бы интересно услышать комментарий автора относительно того, как соотносятся результаты детекции Rad21 с дегроном и в клетках дикого типа методами вестерн-блоттинг и ChIP-Seq. По данным, представленным на Рисунке 43А видно, что сигнал Rad21 в сильных сайтах практически не отличается в клетках с дегроном от клеток дикого типа. В то время, как относительно вестерн блоттинга автор полагает, что антитела не способны связывать белок с дегроном эффективно. Не может ли быть, что результат, наблюдаемый в вестерн-блоттинге связан все-таки не с падением аффинности антител к белку с дегроном, а деградацией материала в лизате клеток С9 или особенностями детекции антителами к Rad21 именно денатурированного материала на вестерн-блоте?

6. Часто в подписях к рисункам отсутствуют указания на то, какая клеточная линия использовалась при анализе (например, в Рисунке 48 не понятно для линии дикого типа или для линии С9 показан профиль связывания Rad21 с ДНК). Также не во всех подписях указано время обработки ауксином.

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:

доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник Группы динамики транскрипционных комплексов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена РАН

Воробьева Надежда Евгеньевна

26.03.2026

Контактные данные:

тел.: 7(926)2790219, e-mail: vorobyeva@genebiology.ru
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:
03.01.03 – молекулярная биология

Адрес места работы:

119334, (Москва) г. Москва, ул. Вавилова, д.34/5,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена РАН, Группа динамики транскрипционных комплексов

Тел.: +7 (499) 135-60-89; e-mail: vorobyeva@genebiology.ru

Подпись сотрудника ФГБУН Института биологии гена РАН

Н.Е. Воробьевой удостоверяю:

зам. директора по инновационной работе ФГБУН Института биологии гена РАН
к.х.н. Садчикова Е.Р.

26.03.2026