

## О Т З Ы В

официального оппонента о диссертационной работе

Шерстюка Владимира Владимировича «Выявление и характеристика ориджинов репликации центра инактивации X-хромосомы полевки *Microtus levis*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Одним из наиболее интересных вопросов современной клеточной биологии является изучение организации и активности районов инициации репликации у высших эукариот. Известно, что такие районы, как правило, состоят из множества ориджинов репликации и каждый из них имеет определенную эффективность, которая регулируется множеством генетических и эпигенетических факторов. Однако до сих пор нет полного представления о том, каким образом в ходе клеточной дифференцировки происходит выбор ориджинов, с которых начинается инициация репликации. Следовательно, изучение ориджинов репликации и их эпигенетических характеристик в конкретных зонах инициации репликации в различных типах клеток может быть важным шагом для понимания природы их регуляции.

В данной работе в качестве одной из таких зон был выбран центр инактивации X-хромосомы у полевки - одного из активно изучаемых модельных видов млекопитающих. Благодаря интенсивным исследованиям на таком классическом объекте как мышь, в настоящее время функции этого центра изучены достаточно глубоко и всесторонне. Однако многие детали локализации районов инициации репликации, взаимосвязи их активности с эпигенетическим состоянием центра инактивации еще до конца не понятны. Также до сих пор отсутствуют данные по консервативности ориджинов репликации в этом ортологичном участке геномов данных близкородственных видов. В связи с этим предложенная работа по детальному изучению свойств ориджинов репликации в центре инактивации X-хромосомы у самцов полевки *M. levis* представляется интересной и весьма актуальной.

Диссертация построена по традиционному плану и включает все необходимые разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список литературы». Кроме этого, есть список использованных сокращений. Работа изложена на 137 страницах текста, включая 31 рисунок, 4 таблицы и список из 296 цитируемых работ.

В разделе «**Введение**» автор убедительно обосновывает актуальность исследования ориджинов репликации и их эпигенетических характеристик в центре инактивации X-

хромосомы у полевки. Сформулированные цели и задачи соответствуют теме диссертационной работы.

Раздел, посвященный **Обзору литературы**, представлен на 47 страницах очень добротно, с привлечением современных данных и, безусловно, представляет собой самостоятельную ценность, отражая состояние изучаемой проблемы в настоящее время. Тематически обзор разделен на две основные части. В первой части кратко, но вполне содержательно охарактеризованы молекулярные механизмы инициации репликации, а также компоненты репликативных комплексов и последовательности ДНК в районах ориджинов репликации у разных представителей эукариот. Большое место также занято детальным и критическим рассмотрением методов картирования ориджинов репликации в геномах эукариот. Во второй части обзора автор затрагивает вопросы неслучайной инактивации X-хромосом у разных представителей млекопитающих, приводит современные данные о молекулярно-генетической организации центров инактивации данных хромосом, их репликационной активности и эпигенетического состояния как у полевки, объекта данной работы, так и у мыши, одного из ближайшего полевым родственного вида.

Структура и содержание обзора вполне обоснованы, поскольку согласуются с тем кругом задач, которые поставлены автором в своей работе. Обзор завершается кратким заключением, в котором рассмотрены оставшиеся нерешенными вопросы и определены главные направления исследований.

В разделе **"Материалы и методы"** исчерпывающе приводится описание используемых автором клеточных линий и методов работы с ними. Достаточно подробно, с возможностью независимого воспроизведения опытов, описан также ряд современных молекулярно-генетических и биохимических методов работы с нуклеиновыми кислотами, хроматином и белками, в частности, таких как иммунопреципитация хроматина, полимеразная цепная реакция в реальном времени.

В разделе **«Результаты и обсуждение»** можно выделить несколько логически связанных между собой частей. Вначале автор провел картирование активных ориджинов репликации и сайтов связывания белков репликативного комплекса (ORC) в локусе X1C *M. levis*. Для картирования активных ориджинов были использованы культуры трех типов клеток, имеющих эмбриональное происхождение и самцовый кариотип 54 XY. С методологической точки зрения выбор этих культур вполне обоснован, поскольку позволяет соотнести выявленные активные ориджины репликации, а затем и модификации гистонов только с одной, активной X-хромосомой, а не с совокупностью двух

гомологичных X-хромосомах. В результате анализа новосинтезированных нитей ДНК с помощью количественной ПЦР в реальном времени автор делает вывод, что центр инактивации X-хромосомы полевки *M. levis* представляет собой зону инициации репликации, в составе которой можно выделить пять ориджинов репликации, представленных множеством точек инициации репликации. При этом отмечается, что относительная эффективность ориджинов в локусе зависит от типа клеток. Затем автор методом хроматин-иммунопреципитации (ChIP) провел поиск сайтов связывания репликативного комплекса (ORC) в фибробластах самцов *M. levis*. Для этого были использованы антитела против компонента данного комплекса – ORC4, а полученную в результате иммунопреципитации ДНК амплифицировали и анализировали при помощи ПЦР в реальном времени. Всего было выявлено 12 сайтов связывания ORC, большинство из которых совпадает с активными районами инициации репликации, при этом на каждый ориджин приходится в среднем по два сайта связывания ORC. По мнению автора, эти данные подтверждают наличие активных ориджинов репликации в соответствующих районах локуса X1C полевки.

В двух следующих разделах представлены результаты анализа нуклеотидного состава ориджинов репликации в локусе X1C *M. levis*. Автором был проведен анализ последовательности ДНК в районах, которые демонстрируют связывание ORC. Практически во всех этих районах не наблюдалось значительного изменения процентного содержания АТ и GC нуклеотидов по сравнению со всем локусом. Однако, по расчетам автора, фактическое количество poly(dA)-poly(dT) трактов вблизи сайтов связывания ORC превышает случайное более, чем в 3 раза. Таким образом, было предположено, что расположение ORC вблизи poly(dA)-poly(dT) трактов в локусе X1C полевки неслучайно. Оказалось, что в районах активных ориджинов репликации этого локуса в подавляющем большинстве случаев выявляются G4 мотивы. Однако с силу большого количества G4 мотивов и ориджинов репликации в локусе, их колокализация может быть случайна, что и было подтверждено методом статистического бутстрэпа. Тем не менее, по мнению автора, G4 мотивы все же могут влиять на эффективность данных ориджинов репликации.

Небольшой, но достаточно интересный раздел работы представлен исследованиями уровней экспрессии генов в центре инактивации X- хромосомы в фибробластах самцов *M. levis*. С помощью обратной транскрипции в сочетании с ПЦР анализом было показано, что в фибробластах самцов полевки все гены локуса, кроме гена *Xist*, активны. Оказалось, что все ориджины репликации в данном локусе, за исключением одного сайта, расположенного значительно выше промотора гена *Tsix*, приходятся на промоторы и

транскрибируемые районы генов. Однако, при неизменном статусе экспрессии ассоциированных с ними генов, активность некоторых ориджинов значительно изменяется в зависимости от типа клеток, из чего автор делает вывод, что активность ориджинов репликации в локусе Х1С полевки не зависит от транскрипционного статуса прилежащего хроматина.

Большая и трудоемкая часть экспериментов посвящена анализу распределения гистона H3 и некоторых модификаций гистонов в данном локусе в фибробластах самцов *M. levis*. В результате ПЦР анализа ChIP реакций с использованием антител против этих гистонов установлено, что наиболее эффективный ориджин репликации в локусе Х1С расположен в промоторе и первом экзоне гена *Xist*. В районе данного ориджина выявляются гистон H3.3 и ацетилированный H3K9, а также наблюдается сниженный уровень монометилирования H4K20 по сравнению со всем локусом.

Заключительная часть раздела результатов и обсуждения посвящена сравнительному анализу расположения ориджинов репликации в локусах Х1С мыши и полевки. С учетом имеющихся и полученных автором данных, были сделаны заключения, что ориджины репликации, расположенные в районе гена *Enox*, в промоторе и первом экзоне гена *Xist* и в районе промотора гена *Tsix* консервативны у обоих видов. Ориджин в четвертом экзоне гена *Xist* выявляется только у полевки. Ориджин в седьмом интроне гена *Xist* активен у мыши, а у полевки в данном районе наблюдается связывание комплекса распознавания ориджинов, но отсутствует активность ориджина.

В целом, Шерстюк В.В. продемонстрировал прекрасное владение значительным количеством современных методов молекулярной и клеточной биологии при решении поставленных задач. Им получен и всесторонне обсужден целый ряд новых данных, расширяющих наши представления об организации и особенностях репликации в районе жизненноважного центра инактивации X-хромосомы у полевки.

Работа четко и ясно изложена. Результаты, полученные в работе, оригинальны. Выбор методов полностью соответствует поставленным задачам, полученные результаты хорошо иллюстрированы и достоверность их не вызывает сомнения. Все выводы хорошо обоснованы, интересны и имеют первостепенное научное значение.

Принципиальных замечаний по работе нет. В качестве пожелания хотелось бы предложить автору продолжить анализ особенностей активации ориджинов репликации и эпигенетического состояния в центре инактивации X-хромосомы помимо фибробластов и в других типах клеток. Такой анализ позволит получить более полную информацию об

особенностях регуляции репликации и ее связь с эпигенетическим и транскрипционных состоянием в данном районе.

По теме диссертации опубликовано 5 работ, в том числе 3 статьи: одна в отечественном журнале, остальные две – в высокорейтинговых международных научных журналах, которые входят в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, определенный ВАК. Работа апробирована на двух международных конференциях.

Содержание диссертации должным образом отражено в автореферате и опубликованных работах. Результаты работы могут иметь практическое значение, в частности, при проведении дальнейших исследований механизмов регуляции ориджинов репликации у млекопитающих и будут полезны для понимания закономерностей функциональной организации и репликации генома эукариот в целом.

Таким образом, можно заключить, что данная работа удовлетворяет всем требованиям, изложенным в пп. 9-14 Положения о порядке присуждения ученых степеней, а ее автор, Шерстюк Владимир Владимирович, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Демаков Сергей Анатольевич,

д.б.н., заведующий лабораторией хромосомной инженерии

Отдела структуры и функции хромосом

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения

Российской академии наук (ИМКБ СО РАН),

630090, г. Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева д. 8/2,

тел (383) 36-39-059,

[demakov@mcb.nsc.ru](mailto:demakov@mcb.nsc.ru)

