

На правах рукописи

Шерстюк Владимир Владимирович

**ВЫЯВЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ОРИДЖИНОВ РЕПЛИКАЦИИ
ЦЕНТРА ИНАКТИВАЦИИ X-ХРОМОСОМЫ ПОЛЕВКИ *MICROTUS
LEVIS***

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук в лаборатории эпигенетики развития, г. Новосибирск.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Закиян Сурен Минасович

Официальные оппоненты: **Демаков Сергей Анатольевич**
доктор биологических наук, заведующий
лабораторией хромосомной инженерии, ФГБУН
Институт молекулярной и клеточной биологии
СО РАН, г. Новосибирск

Жарков Дмитрий Олегович
доктор биологических наук, доцент,
руководитель группы взаимодействий
биополимеров, ФГБУН Институт химической
биологии и фундаментальной медицины СО
РАН, г. Новосибирск

Ведущее учреждение: Научно-исследовательский институт биологии и биофизики Томского государственного университета

Защита диссертации состоится «__»_____2015 г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.011.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук в ИЦиГ СО РАН в конференц-зале Института по адресу:

пр. академика Лаврентьева 10, г. Новосибирск, 630090

тел: (383) 363-49-06 (1321); факс: (383) 333-12-78;

e-mail: dissov@bionet.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института: www.bionet.nsc.ru.

Автореферат разослан «__»_____2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.М. Хлебодарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Репликация ДНК – это основной процесс S фазы клеточного цикла. Точка начала репликации или ориджин репликации (от англ. *origin of replication*) – это последовательность нуклеотидов в геноме, на которых осуществляется инициация репликации. В отличие от прокариот, геном которых содержит, как правило, один ориджин репликации, геном эукариот реплицируется с большого количества ориджинов (Gao, Zhang, 2007). В одной из первых работ по изучению репликации ДНК у эукариот было показано, что для репликации генома млекопитающих используется 30,000-50,000 ориджинов (Huberman, Riggs, 1966). При этом данное количество – лишь малая часть от всех ориджинов в геноме. На сегодняшний день в результате развития полногеномных технологий были картированы ориджины репликации в геномах мыши и человека (Besnard *et al.*, 2012; Cayrou *et al.*, 2011). Установлено, что геном человека содержит 200,000-250,000 ориджинов. Данные работы также свидетельствуют о наличии в геноме зон инициации репликации, состоящих из множества ориджинов репликации. Таким образом, встает вопрос о том, как происходит выбор ориджинов, на которых произойдет инициация репликации в каждом конкретном клеточном цикле. Считается, что выбор ориджина репликации в пределах зоны происходит случайно с определенной вероятностью или эффективностью. Каждый ориджин репликации имеет определенную эффективность, которая, в свою очередь, регулируется множеством эпигенетических факторов и механизмов. Полногеномный анализ ориджинов репликации позволяет выявить корреляцию между расположением и эффективностью ориджинов и определенными эпигенетическими характеристиками. Однако, такой анализ не дает полного представления о механизмах и факторах, непосредственно участвующих в регуляции эффективности отдельных ориджинов в пределах зон инициации репликации. Таким образом, изучение ориджинов репликации и их эпигенетических характеристик в пределах отдельных зон инициации репликации необходимо для понимания и установления механизмов их регуляции.

Малоизученными также остаются изменения в эффективности ориджинов, происходящие в ходе клеточной дифференцировки. Сравнение паттерна инициации репликации в различных типах клеток будет способствовать решению данного вопроса, а также установлению определяющих эффективность ориджинов факторов.

Кроме того, на сегодняшний день практически отсутствуют данные по консервативности ориджинов репликации в ортологичных участках геномов близкородственных видов. В данном исследовании планировалось картировать ориджины репликации в центре инактивации X-хромосомы в трофобластных стволовых (ТС) клетках, клетках экстраэмбриональной эндодермы (XEN) и в фибробластах полевки *Microtus levis*. Также планировалось локализовать районы связывания комплекса распознавания ориджинов, который необходим для функционирования ориджина репликации и определяет его месторасположение, и провести анализ нуклеотидных последовательностей и эпигенетических характеристик выявленных ориджинов репликации в данном локусе в

фибробластах полевки. Центр инактивации X-хромосомы *M. levis* представляет собой протяженный район размером около 60 т.п.н., в состав которого входят четыре гена: *Enox*, *Xist*, *Tsix*, *Slc7a3*, первые три из которых кодируют длинные некодирующие РНК и участвуют в процессе X-инактивации у самок млекопитающих.

Ранее были выявлены ориджины репликации в центре инактивации X-хромосомы мыши *Mus musculus* (Gomez, Brockdorff, 2004; Rowntree, Lee, 2006). Таким образом, поиск и характеристика ориджинов репликации в центре инактивации X-хромосомы полевки *M. levis* позволит установить степень консервативности ориджинов в данном локусе у двух данных видов млекопитающих, а также выявить общие механизмы регуляции их эффективности.

Цель работы – выявить и охарактеризовать ориджины репликации в центре инактивации X-хромосомы у самцов полевки *M. levis*.

Задачи:

1. Выявить расположение активных ориджинов репликации в центре инактивации X-хромосомы в трофобластных стволовых клетках, клетках экстраэмбриональной эндодермы и в фибробластах самцов полевки *M. levis*;
2. Определить локализацию сайтов связывания комплекса распознавания ориджинов (ORC) в центре инактивации X-хромосомы в фибробластах самцов полевки *M. levis*;
3. Провести анализ нуклеотидного состава районов связывания ORC в центре инактивации X-хромосомы полевки *M. levis*;
4. Провести анализ плотности распределения гистона H3 и его варианта H3.3 в центре инактивации X-хромосомы в фибробластах самцов полевки *M. levis*;
5. Определить паттерн следующих модификаций гистонов: ацетилизованного H3K9, монометилизованного H4K20 и триметилизованного H3K27 в центре инактивации X-хромосомы в фибробластах самцов полевки *M. levis*;
6. Провести сравнительный анализ расположения и активности ориджинов репликации в центре инактивации X-хромосомы *M. levis* и *M. musculus*.

Научная новизна работы. Впервые выявлены ориджины репликации в центре инактивации X-хромосомы полевки *M. levis*. Показано, что центр инактивации X-хромосомы *M. levis* представляет собой зону инициации репликации, в состав которой входит как минимум пять ориджинов репликации. Локализованы сайты связывания комплекса распознавания ориджинов в данном локусе, что подтверждает наличие ориджинов репликации. Кроме того, выявлен один потенциальный ориджин репликации. Показано, что эффективность обнаруженных ориджинов изменяется в зависимости от типа клеток. Проведен анализ нуклеотидных последовательностей в районах ориджинов, а также

эпигенетических характеристик в исследуемом локусе. Проведен сравнительный анализ ориджинов репликации в данном локусе у *M. musculus* и *M. levis*. Выявлены консервативные и переменные ориджины в данном локусе у данных видов.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Результаты данной работы вносят вклад в понимание локализации ориджинов репликации и их регуляции в геноме млекопитающих и будут интересны для исследователей, занимающихся изучением организации генома млекопитающих и процесса инициации репликации.

Основные положения работы, выносимые на защиту.

1. Центр инактивации X-хромосомы полевки *M. levis* представляет собой зону инициации репликации, в составе которой можно выделить пять ориджинов репликации;
2. Наиболее эффективный ориджин репликации в центре инактивации X-хромосомы полевки *M. levis* ассоциирован с модификациями гистонов, характерными для открытой структуры хроматина.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2011 г.), Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов-2013 (Москва, 2013 г.), семинарах и отчетных сессиях Института цитологии и генетики СО РАН. По материалам диссертации опубликованы три статьи – в рецензируемых отечественном и зарубежных журналах из списка ВАК.

Вклад автора. Основные результаты получены автором самостоятельно. Культивирование трофобластных стволовых клеток осуществлялось совместно с к.б.н. Е.А. Васьковой. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводилось совместно с к.б.н. А.И. Шевченко.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из оглавления, списка сокращений, введения, обзора литературы, описания используемых материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 137 страницах, содержит 31 рисунок и 4 таблицы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Объект исследования. Для картирования ориджинов репликации в центре инактивации X-хромосомы была выделена нсДНК размером от 750 до 1500 п.н. из культур фибробластов, ТС клеток и клеток XEN самцов *M. levis*. Модификации хроматина в центре инактивации X-хромосомы были исследованы в культуре фибробластов самцов *M. levis*. Используемые линии клеток были получены и охарактеризованы в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН и имеют кариотип 54 XY. Нуклеотидная последовательность центра инактивации X-хромосомы полевки *M. levis* определена (Nesterova *et al.*, 2001) и зарегистрирована в базе данных EMBL под регистрационным номером [AJ310130].

2. Методы работы с клеточными культурами

2.1 Условия культивирования. Клетки культивировали при 37°C в атмосфере 5% углекислого газа. Пересев фибробластов, ТС клеток и клеток XEN проводили каждые 2-4 дня, в зависимости от плотности клеток. Фибробласты и ТС клетки промывали буфером PBS, после чего добавляли 0,05% для ТС клеток и 0,25% для фибробластов раствор трипсина, соответственно. Через 2-3 мин. трипсин нейтрализовали ростовой средой, ресуспендировали клетки и переносили суспензию в новую культуральную емкость в соотношении от 1:3 до 1:5. Клетки XEN снимали с культуральной поверхности механически и рассаживали в соотношении 1:3. Для ТС клеток и клеток XEN культуральную поверхность предварительно обрабатывали раствором 0,1% желатина в течение 10 мин. при комнатной температуре.

3. Получение нсДНК из асинхронно делящейся культуры клеток. Для выделения нсДНК использовали от 20 до 100 миллионов клеток. Клетки дважды промывали PBS при 4°C и снимали с помощью трипсина в случае фибробластов и ТС клеток или механически в случае XEN клеток. Полученную суспензию клеток центрифугировали (1000 об./мин., 3 мин.) и ресуспендировали в PBS, содержащем 10% глицерина. Затем суспензию клеток наносили в 1,2% агарозный гель, содержащий 50 mM NaOH, 1 mM ЭДТА и лизировали в течение 10 минут (Gerhardt *et al.*, 2006). Электрофорез смеси проводили в течение шести часов при 5°C и напряжении 1,5 В/см в щелочном буфере. Одновременно с образцом в соседней дорожке проводили электрофорез маркера молекулярного веса ДНК. После электрофореза полоски геля с геномной ДНК и маркером инкубировали в течение 30 мин. в нейтрализующем буфере, маркер и геномную ДНК отдельно (Staib, Grummt, 1997). Для маркера использовали нейтрализующий буфер с бромистым этидием, в концентрации 0,5 мкг/мл. Маркер молекулярного веса ДНК визуализировали с помощью УФ света и фотографировали рядом с линейкой. На геле с геномной ДНК определяли положение фракций ДНК, содержащих фрагменты размером от 750 до 1500 п.н. и вырезали их из геля. Необходимую для работы фракцию нсДНК (750-1500 п.н.) выделяли из геля с помощью набора QIAquick gel extraction kit, согласно инструкции производителя с некоторыми модификациями.

4. Иммунопреципитация хроматина (ChIP). ChIP проводили согласно протоколу (Lee *et al.*, 2006), с некоторыми модификациями. Для получения хроматина из культуры фибробластов самцов *M. levis* клетки (~10⁷ клеток) снимали с помощью трипсина и промывали два раза PBS. Клетки осаждали при 1000 об./мин., 5 мин. и ресуспендировали в 9 мл ростовой среды. К суспензии клеток добавляли 270 мкл 37% формальдегида, инкубировали в течение 5 мин. при постоянном перемешивании. Добавляли 1 мл 1,25 М раствора глицина, инкубировали в течение 5 мин. при постоянном перемешивании и центрифугировали 5 мин. при 400×g и 4°C. Полученный осадок дважды промывали PBS, 4°C, осаждали 5 мин. при 700×g и 4°C. Клетки лизировали до ядер добавлением 1 мл лизирующего буфера №1 для ChIP в течение 10 мин. на льду при постоянном перемешивании. Ядра осаждали 5 мин. при 1350×g и 4°C, ресуспендировали в лизирующем буфере №2 для ChIP, инкубировали в течение 5 мин. при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Осаждали, как написано выше, и ресуспендировали в 300 мкл лизирующего буфера №3 для

ChIP. Ядра клеток обрабатывали ультразвуком на приборе Vibra-Cell VCX130 (Sonics) при следующих параметрах: амплитуда 30%, 4 цикла по 30 сек. Между циклами образец инкубировали на льду 30 сек. В результате получали фрагменты хроматина размером от 100 до 500 п.н. К полученному хроматину добавляли 1/10 объема 10% Triton X-100 и центрифугировали в течение 10 мин. при 16,000×g и 4°C. Супернатант переносили в чистую пробирку. Для одной реакции ChIP использовали количество хроматина соответствующего 2 миллионам клеток (в случае реакций с антителами против гистона H3, H3.3 и модификаций гистонов), либо 10 миллионам клеток (в случае реакции с антителами против ORC4). Реакцию проводили в 500 мкл лизирующего буфера №3, содержащего 1% Triton X-100. К хроматину добавляли антитела и инкубировали в течение 16 часов при 4°C и постоянном перемешивании. Для положительного контроля параллельно проводили реакцию с антителами против гистона H3, а для отрицательного – реакцию без антител. Отбирали количество хроматина, соответствующего 2 миллионам клеток, и очищали как описано далее (Input хроматин). Затем к образцам добавляли 20 мкл магнитных шариков, дважды промытых в 1,5 мл блокирующего буфера для ChIP. Инкубировали 6 часов при 4°C. Образцы промывали 5 раз в 1 мл отмывочного буфера для ChIP и 1 раз в 1 мл буфера TE, содержащем 50 mM NaCl. Магнитные шарики центрифугировали 3 мин. при 960×g и 4°C, отбирали остатки буфера и добавляли 200 мкл буфера для элюции. Элюцию проводили в течение 30 мин. при 65°C, периодически перемешивая. Магнитные шарики осаждали центрифугированием в течение 1 мин. при 16,000×g. Супернатант переносили в чистую пробирку и инкубировали от 6 до 15 часов при 65°C. К Input хроматину добавляли 3 объема буфера для элюции и далее инкубировали вместе с остальными образцами. К образцам и Input хроматину добавляли РНКазу А, конечная концентрация 200 мкг/мл, протеиназу К, конечная концентрация 400 мкг/мл, и инкубировали 2 часа при 55°C. Образцы очищали с использованием набора MinElute PCR Purification Kit в соответствии с инструкцией производителя. ДНК, полученную в результате ChIP реакций с антителами против ORC4, амплифицировали с использованием набора GenomePlex® Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit в соответствии с инструкцией производителя. Амплификацию проводили на приборе GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems).

5. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Для проведения одной реакции (30 мкл) смешивали: 10x буфер для ДНК-полимеразы Taq №2 – 3 мкл; dATP, dTTP, dCTP, dGTP (2,5 mM каждый) – 3 мкл; праймеры (10 mM каждый) – 0,9 мкл; зонд (10 mM, 5' – Tamra, 3' – BHQ2) – 0,75 мкл; матрица – 5 мкл выделенной и разбавленной до 1 мл нсДНК; ДНК-полимераза Taq (1 ед./мкл) – 0,6 мкл; H₂O до 30 мкл.

Реакцию проводили на амплификаторе iQ5 (Bio-Rad), либо LightCycler 480 (Roche) в течение 40 циклов. Каждый цикл состоял из двух стадий: 95°C – 15 сек., 60°C – 1 мин. Анализ полученных данных проводили в программах Bio-Rad iQ5 Software v2.0 (Bio-Rad), LightCycler 480 SW 1.5 (Roche), Microsoft Excel 2013. При анализе нсДНК представленность целевой ДНК последовательности определяли сравнением значения Ct в каждом образце со стандартной кривой,

полученной из 7 точек серийного разведения рекомбинантной ДНК (множитель разведения 10х). При анализе ДНК, полученной в реакции иммунопреципитации хроматина, представленность целевой ДНК последовательности определяли сравнением значения Ср в каждом образце со стандартной кривой, полученной из 4 точек серийного разведения Input ДНК (множитель разведения 5х). Все ПЦР-реакции были повторены два раза. В качестве отрицательного контроля вместо матрицы в реакцию добавляли H₂O. Статистический анализ результатов ПЦР анализа ChIP реакций проводили с использованием метода однофакторного дисперсионного анализа и критерия Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1.1. Картирование активных ориджинов репликации методом NSAA в ТС клетках, клетках XEN и фибробластах самцов полевки *M. levis*

Картирование активных ориджинов репликации в локусе ХИС *M. levis* было проведено в ТС клетках, клетках XEN и фибробластах. Данные линии клеток были получены ранее в лаборатории эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН из эмбрионов *M. levis* и имеют кариотип 54 XY. Таким образом исследуемый локус представлен одной копией на геном, что дает возможность быть уверенными в том, что выявленные активные ориджины репликации, а также модификации гистонов, не представляют совокупность таковых на двух гомологичных X-хромосомах. Картирование активных ориджинов проводили методом анализа количества новосинтезированных нитей ДНК (NSAA: nascent strands abundance assay). Анализ количества нсДНК длиной 750-1500 п.н. в различных участках локуса ХИС *M. levis* проводили методом количественной ПЦР в реальном времени, детекцию продуктов амплификации осуществляли с использованием зондов TaqMan. На свободные от повторенных последовательностей ДНК районы ХИС *M. levis* было подобрано тридцать пар праймеров. НсДНК размером от 750 до 1500 п.н. выделяли из асинхронно делящихся культур клеток. Количество нсДНК в каждой точке определяли по методу стандартной кривой. Для ее построения использовали рекомбинантные ДНК на основе фагмиды pBluescript II SK (+), содержащие в качестве встроеной фрагменты ДНК локуса ХИС *M. levis*, известной концентрации (Nesterova *et. al.*, 2001). При построении гистограмм количество копий нсДНК в каждой точке нормировали на сайт, содержащий наименьшее количество копий нсДНК для каждого типа клеток в отдельности. В качестве критерия для ориджина репликации использовали относительное обогащение нсДНК превышающее минимальный уровень в 4, 20, 10 раз для ТС клеток, клеток XEN и фибробластов, соответственно. В результате анализа паттерна нсДНК в локусе ХИС в ТС клетках было выявлено четыре активных ориджинов репликации, которые расположены в районе гена *Enox* (сайты 1-4), в первом экзоне гена *Xist* (сайты 7-9, 11), в четвертом экзоне гена *Xist* (сайт 15), в районе промотора гена *Tsix* (сайт 25) (Рисунок 1 А, Б). В клетках XEN было выявлено четыре активных ориджина репликации, которые расположены в первом экзоне гена *Xist* (сайты 7-9, 11), в четвертом экзоне гена *Xist* (сайт 15), в первом интроне гена *Tsix* около 700 п.н. ниже сайта старта транскрипции гена *Tsix*, в районе 4 т.п.н. выше сайта старта транскрипции гена *Tsix* (сайты 24, 26), в районе гена *Slc7a3* (сайт 29)

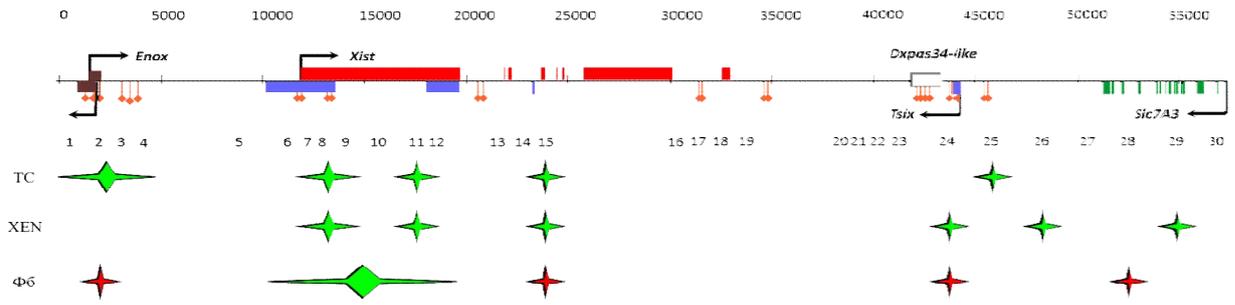
(Рисунок 1 А, В). В фибробластах выявлен один наиболее активный ориджин репликации, расположенный в первом экзоне и в районе промотора гена *Xist* (сайты 6-12) (Рисунок 1 А, Г). Кроме того, в фибробластах выявляется активность ориджинов, расположенных в районе гена *Enox* (сайт 2), в четвертом экзоне гена *Xist* (сайт 15), в первом интроне гена *Tsix* (сайт 24) и в районе гена *Slc7a3* (сайт 28). Эффективность данных ориджинов значительно ниже по сравнению с эффективностью ориджина в первом экзоне и в промоторе гена *Xist*. Таким образом, инициация репликации в локусе ХИС *M. levis* наблюдается в протяженных районах размером до 6 т.п.н. При этом в зависимости от типа клеток различные участки в пределах одного ориджина иницируют репликацию с различной эффективностью. Большое количество участков, в которых происходит инициация репликации, позволяет предположить, что локус ХИС *M. levis* представляет собой зону инициации репликации, в составе которой можно выделить пять ориджинов репликации. При этом данные ориджины репликации, за исключением расположенного в четвертом экзоне гена *Xist*, по-видимому, имеют множество точек инициации репликации.

1.2. Локализация сайтов связывания ORC в локусе ХИС в фибробластах самцов *M. levis*

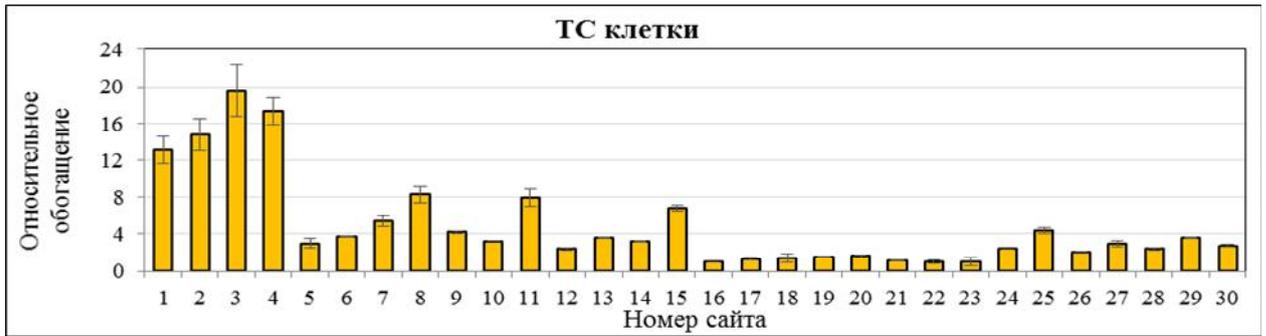
ORC – основной компонент pre-RC, который определяет локализацию ориджинов (Diffley *et al.*, 1994). Поиск сайтов связывания данного комплекса позволяет, во-первых, подтвердить наличие ориджинов репликации, картированных методом NSAA, а во-вторых, выявить потенциальные ориджины, которые неактивны в данных типах клеток при данных условиях культивирования. Сайты связывания ORC выявляли методом ChIP с использованием антител против компонента данного комплекса – ORC4 в фибробластах самцов *M. levis*. Полученную в результате ChIP реакции с антителами против ORC4 ДНК амплифицировали с использованием набора GenomePlex® Complete Whole Genome Amplification (WGA) Kit и анализировали при помощи ПЦР в реальном времени. Результаты ПЦР анализа в реальном времени этой и всех последующих ChIP реакций представлены в виде гистограмм, относительное количество ДНК в каждой точке определяли в процентах от общего количества хроматина, использованного для реакции ChIP (Input хроматин). В качестве отрицательного контроля проводили ChIP реакцию без использования антител. Отрицательный контроль также амплифицировали с использованием WGA Kit. Статистический анализ проводили с использованием метода однофакторного дисперсионного анализа и критерия Фишера. Связывание ORC определяли в сравнении с соседними районами.

В результате анализа в фибробластах *M. levis* было выявлено 12 сайтов связывания ORC. Данные сайты располагаются в районе гена *Enox* (сайты 1, 3), в промоторе (сайт 6), в первом экзоне (сайт 8), в третьем интроне (сайт 14), в четвертом экзоне (сайт 15), в седьмом интроне (сайт 16) гена *Xist*, два сайта в первом интроне гена *Tsix*: около 10 т.п.н. и 3 т.п.н. ниже сайта старта транскрипции гена *Tsix* (сайты 19 и 23), в промоторе гена *Tsix* (сайт 25), в районе гена *Slc7a3* (сайты 28 и 29) (Рисунок 2).

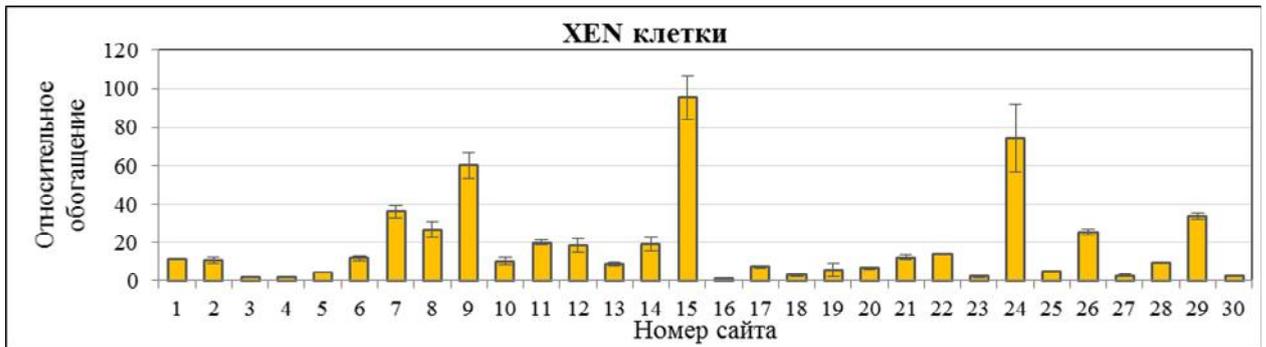
A



Б



В



Г

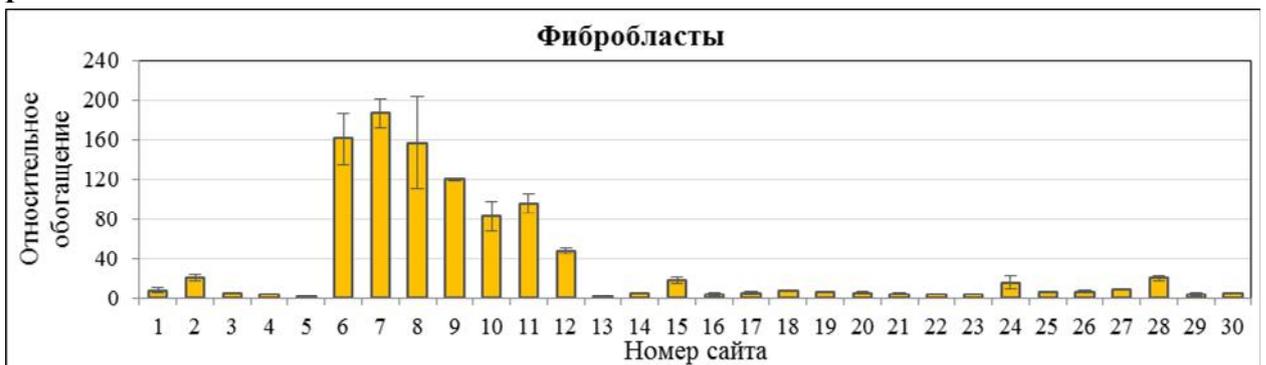


Рисунок 1. Картирование ориджинов репликации методом NSAA в локусе XIC в ТС клетках, клетках XEN и в фибробластах самцов *M. levis*.

(А). Схема расположения ориджинов репликации в локусе XIC *M. levis* в трех типах клеток. Экзоны генов отображены прямоугольниками, направление транскрипции показано стрелками, оранжевые точки – CGI. Цифрами внизу обозначено расположение пар праймеров, используемых в работе. Активные ориджины репликации обозначены зелеными звездочками, ориджины, показывающие низкую активность в фибробластах, – красными звездочками.

(Б-Г). Результаты количественного ПЦР анализа нсДНК длиной 750-1500 п.н. в ТС клетках (Б), клетках XEN (В) и в фибробластах (Г). По оси абсцисс расположены сайты, ограниченные парами праймеров, по оси ординат относительное обогащение нсДНК по сравнению с сайтом, показавшим наименьшее количество копий нсДНК в данном типе клеток.

Девять из двенадцати районов связывания ORC совпадают с сайтами, демонстрирующими инициацию репликации хотя бы в одном из типов клеток (сайты 1, 3, 6, 8, 14, 15, 25, 28, 29). Расположение сайтов связывания ORC подтверждает наличие ориджинов репликации, картированных методом NSAA в данных районах.

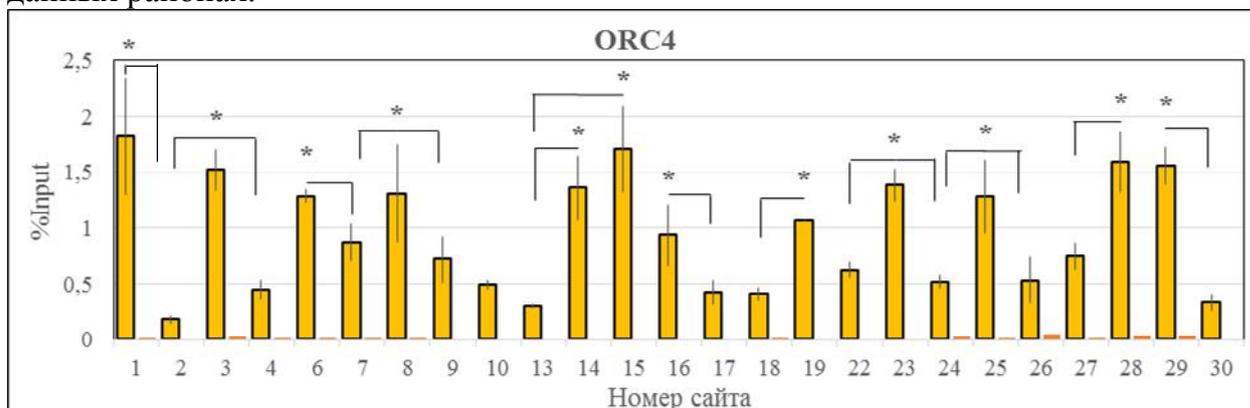


Рисунок 2. Локализация ORC в локусе XIC в фибробластах *M. levis*.

Результаты ПЦР анализа в реальном времени реакций ChIP с использованием антител против ORC4. По оси абсцисс расположены сайты, ограниченные парами праймеров, по оси ординат количество ДНК выраженное в процентах от Input хроматина. Темно-оранжевые столбики – отрицательный контроль (ChIP реакция без антител). Звездочками обозначены точки, демонстрирующие достоверное увеличение количества ДНК по сравнению с соседними районами, $P < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Фишера).

2. Анализ нуклеотидного состава ориджинов репликации в локусе XIC *M. levis*

Несмотря на отсутствие консенсусной последовательности ориджинов репликации у высших эукариот, в ряде исследований было показано, что многие ориджины локализуются в районах с повышенным содержанием АТ-нуклеотидов и присутствием poly(dA)-poly(dT) трактов (Aladjem, 2007; Altman, Fanning, 2004; Karnani *et al.*, 2011). Проведен анализ последовательности ДНК в пределах от -500 до +500 п.н. от праймерных пар, которые демонстрируют связывание ORC. Практически во всех районах связывания ORC не наблюдалось значительного изменения процентного содержания АТ и GC нуклеотидов по сравнению со всем локусом (процент АТ-пар около 56), за исключением сайтов, расположенных в районе гена *Enox* (сайт 1, процент АТ-пар около 65) и в районе гена *Slc7a3* (сайт 29, процент АТ-пар около 47).

Poly(dA)-poly(dT) тракты представляют собой последовательности из повторяющихся нуклеотидов (А на одной цепи ДНК, Т на другой) длиной от 10 п.н. Данные тракты препятствуют формированию нуклеосом, что приводит к образованию свободных от нуклеосом районов длиной до 300 п.н. (Segal, Widom, 2009). ORC преимущественно связывается в районах с низкой нуклеосомной плотностью (Verbenetz *et al.*, 2010; Eaton *et al.*, 2010, 2011; Lubelsky *et al.*, 2011; MacAlpine *et al.*, 2010; Petesch, Lis, 2008; Yin *et al.*, 2009). В локусе XIC *M. levis* было выявлено 27 poly(dA)-poly(dT) трактов, при этом 10 из них расположены на расстоянии менее 600 п.н. от ближайшего сайта связывания ORC. 6 из 12 районов связывания ORC, расположены на расстоянии менее 600 п.н. от poly(dA)-poly(dT) трактов.

Проверку случайности расположения poly(dA)-poly(dT) трактов вблизи сайтов связывания ORC и наоборот проводили методом статистического бутстрэпа с использованием программы Microsoft Excel. При случайном распределении poly(dA)-poly(dT) трактов в локусе XIC среднее количество трактов, расположенных вблизи сайтов связывания ORC, составляет 3 тракта (SD=1,57; 1000 итераций). Фактическое количество poly(dA)-poly(dT) трактов, расположенных вблизи сайтов связывания ORC, (10 из 27, 37%) превышает случайное в 3,33 раза. При случайном распределении районов связывания ORC, вблизи poly(dA)-poly(dT) трактов располагается в среднем 2 района (SD=1,27; 1000 итераций). Фактическое количество сайтов связывания ORC, расположенных вблизи poly(dA)-poly(dT) трактов, (6 из 12, 50%) превышает случайное в 3 раза. Таким образом, можно предположить, что расположение ORC вблизи poly(dA)-poly(dT) трактов в локусе XIC полевки неслучайно.

3. Анализ ассоциации ориджинов репликации с G4 мотивами

В ряде работ было показано, что около 70% ориджинов репликации в геноме мыши и 90% в геноме человека ассоциированы с мотивами, способными формировать G-квадруплексы (Besnard *et al.*, 2012; Caugou *et al.*, 2012). Для того, чтобы выяснить наблюдается ли ассоциация ориджинов в локусе XIC *M. levis* с G4 мотивами, последовательность локуса была проанализирована на наличие данных мотивов. Анализ был проведен с использованием программы QGRS mapper (Kikin *et al.*, 2006). Для определения G4 мотивов была выбрана следующая последовательность: G₃N₁₋₁₅G₃N₁₋₁₅G₃N₁₋₁₅G₃ (Besnard *et al.*, 2012; Caugou *et al.*, 2012). В локусе XIC *M. levis* было выявлено 25 G4 мотивов. Установлено, что в районах активных ориджинов репликации в локусе XIC *M. levis*, за исключением ориджина в четвертом экзоне гена *Xist*, выявляются G4 мотивы. Большое количество G4 мотивов и районов, инициирующих репликацию, в локусе XIC *M. levis* может быть причиной того, что ассоциация ориджинов с G4 мотивами случайна. Для того, чтобы проверить данное предположение, был проведен анализ методом статистического бутстрэпа с использованием программы Microsoft Excel. При случайном распределении G4 мотивов в локусе XIC среднее количество мотивов, ассоциированных с ориджинами репликации, составляет 12 мотивов (SD=2,4; 1000 итераций). Фактическое количество G4 мотивов, ассоциированных с ориджинами (15 из 25, 60%), превышает случайное в 1,25 раза. При случайном распределении сайтов, демонстрирующих инициацию репликации, в локусе XIC полевки количество сайтов, ассоциированных с G4 мотивами, составляет 7 сайтов (SD=2,03; 1000 итераций). Фактическое количество сайтов, демонстрирующих инициацию репликации и ассоциированных с G4 мотивами, составляет 7 сайтов и не превышает случайное. Данные результаты указывают на случайную ассоциацию G4 мотивов с ориджинами репликации в локусе XIC полевки.

4. Статус экспрессии генов в локусе XIC в фибробластах самцов *M. levis*

В одной из работ было показано, что ориджины преимущественно ассоциированы с генами, транскрибирующимися на умеренном уровне (Martin *et al.*, 2011). С другой стороны, анализ расположения ориджинов, картированных методом bubble-trap, показал ассоциацию значительной части ориджинов с неактивными генами в клетках человека (Mesner *et al.*, 2013). Показано, что

активность ориджинов репликации в локусе ХИС мыши не зависит от активности ассоциированных с ними генов (Gomez, Brockdorff, 2004; Rowntree, Lee, 2006). В ТС клетках и клетках XEN на активной X-хромосоме самки и единственной X-хромосоме самца гены *Enox*, *Tsix* и *Slc7a3* активны, а ген *Xist* неактивен (Shevchenko *et al.*, 2011). С помощью ПЦР анализа с обратной транскрипцией установлено, что в используемой линии фибробластов самцов *M. levis* данные гены имеют аналогичное состояние. Ориджины репликации в локусе ХИС *M. levis* располагаются в транскрибируемых районах и промоторах генов, за исключением сайта инициации репликации, расположенного на расстоянии 5 т.п.н. выше сайта старта транскрипции гена *Tsix* (сайт 26). Однако, активность некоторых ориджинов значительно изменяется в зависимости от типа клеток, при неизменном статусе экспрессии ассоциированных с ними генов. Таким образом, активность ориджинов репликации в локусе ХИС *M. levis* не зависит от транскрипционного статуса прилежащего хроматина.

5. Распределение гистона H3 и его варианта H3.3 в локусе ХИС *M. levis*

Как известно, ORC, зачастую, связывается в районах, для которых характерна пониженная плотность нуклеосом и наличие варианта гистона H3.3 (Deal *et al.*, 2010; Eaton *et al.*, 2011; MacAlpine *et al.*, 2010; Roy *et al.*, 2010; Stroud *et al.*, 2012). В данной работе был проведен анализ распределения гистона H3 и его варианта H3.3 в исследуемом локусе в фибробластах самцов *M. levis*. Установлено, что значимое снижение плотности гистона H3 наблюдается в первом экзоне гена *Xist* (сайт 10) (Рисунок 3). Статистический анализ здесь и далее проводили с использованием метода однофакторного дисперсионного анализа и критерия Фишера. Снижение плотности гистона H3 определяли в сравнении со средним значением в локусе.

Вариант гистона H3 – гистон H3.3 наблюдается вблизи гена *Enox* (сайт 4), в промоторе и первом экзоне гена *Xist* (сайты 6-9), в первом и третьем интронах гена *Xist* (сайты 13-14), на расстоянии около 6 т.п.н. ниже сайта старта транскрипции гена *Tsix* (сайт 20) (Рисунок 4).

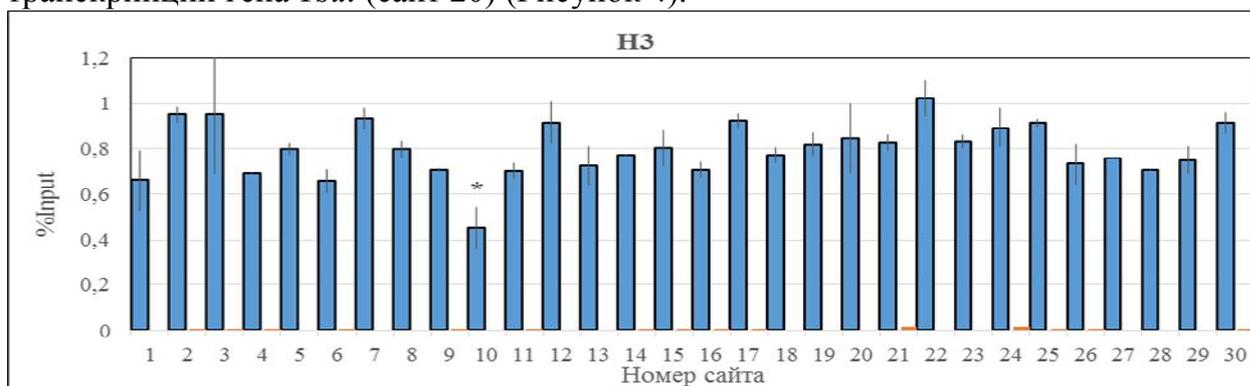


Рисунок 3. Паттерн распределения гистона H3 в локусе ХИС в фибробластах *M. levis*.

Результаты ПЦР анализа в реальном времени реакций ChIP с использованием антител против H3. По оси абсцисс расположены сайты, ограниченные парами праймеров, по оси ординат – количество ДНК, выраженное в процентах от Input хроматина. Звездочками обозначены точки, демонстрирующие достоверное снижение плотности гистона H3 по сравнению со средним значением в локусе, $P < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Фишера).

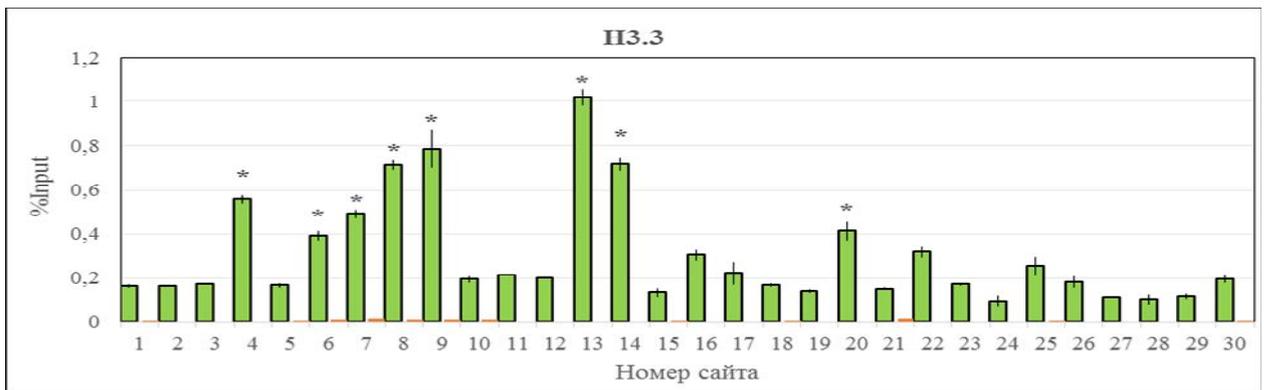


Рисунок 4. Паттерн распределения гистона H3.3 в локусе XIC в фибробластах *M. levis*. Результаты ПЦР анализа в реальном времени реакций ChIP с использованием антител против H3.3. По оси абсцисс расположены сайты, ограниченные парами праймеров, по оси ординат – количество ДНК, выраженное в процентах от Input хроматина. Темно-оранжевые столбики – отрицательный контроль (ChIP реакция без антител). Звездочками обозначены точки, демонстрирующие достоверное увеличение уровня H3.3 по сравнению со средним значением в локусе, $P < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Фишера).

Таким образом, в районах связывания ORC не наблюдается снижение плотности гистона H3, и лишь для части из них характерно наличие гистона H3.3 (сайты 6, 8, 14). Наиболее эффективный ориджин репликации в фибробластах *M. levis* ассоциирован с минимальной плотностью гистона H3, наблюдаемой в первом экзоне гена *Xist* (сайт 10) и с протяженным участком длиной около 3 т.п.н., содержащем гистон H3.3.

6. Модификации хроматина в локусе XIC в фибробластах самцов *M. levis*. Паттерн ацетилирования H3K9, метилирования H4K20 и триметилирования H3K27

Модификация N-концевых остатков гистонов – один из механизмов регуляции структуры хроматина, которая влияет на эффективность ориджинов репликации. Был проведен анализ паттерна H3K9ac, H4K20me1 и H3K27me3 в локусе XIC в фибробластах самцов *M. levis* методами ChIP и ПЦР в реальном времени. Известно, что ацетилирование гистонов H3, в частности H3K9ac, и H4 характерно для открытого хроматина и ассоциировано со многими ориджинами репликации (Cadoret *et al.*, 2008; Sequeira-Mendes *et al.*, 2009). H4K20me1 участвует в регуляции лицензирования ориджинов репликации, кроме того для нескольких ориджинов в геноме человека показан повышенный уровень данной модификации (Tardat *et al.*, 2010). H3K27me3 участвует в репрессии генов и свойственно неактивному хроматину. Данная модификация и белки группы Polycomb играют важную роль в регуляции репликации ДНК, в частности, в средней и поздней S фазе у дрозофилы, человека и мыши (Aoto *et al.*, 2008; Lo Sardo *et al.*, 2013; Posfai *et al.*, 2012). Кроме того, наблюдается высокий уровень ассоциации ориджинов, активирующихся в средней S фазе, с H3K27me3 (Picard *et al.*, 2014). Достоверное увеличение уровня H3K9ac, H4K20me1 и H3K27me3 определяли в сравнении со средним значением в локусе с использованием однофакторного дисперсионного анализа и критерия Фишера.

H3K9ac наблюдается в промоторе, первом экзоне и первом интроне гена *Xist* (сайты 6, 8-11, 13) (Рисунок 5). Таким образом, район наиболее эффективного ориджина в фибробластах самцов *M. levis* характеризуется

присутствием гистона H3.3 и H3K9ac, причем максимальный уровень H3K9ac наблюдается в промоторе гена *Xist*. H4K20me1 наблюдается во всем локусе ХИС *M. levis* (Рисунок 6). Однако в районе, содержащем активный ориджин в фибробластах *M. levis*, уровень данной модификации, по сравнению с остальными участками в локусе, значительно снижен (сайты 5-12). Снижение уровня H4K20me1 в первом экзоне и промоторе гена *Xist* также свидетельствует об открытой структуре хроматина, на что указывает присутствие гистона H3.3 и H3K9ac. В результате анализа паттерна H3K27me3 установлено, что данная модификация локализуется в 3' районе первого экзона (сайты 11-12) и в седьмом интроне гена *Xist* (сайты 16-18), в промоторе, первом экзоне и первом интроне гена *Tsix*, а также в участке 5 т.п.н. выше сайта старта транскрипции гена *Tsix* (сайты 21-26), в 5' области гена *Slc7a3* (сайт 30) (Рисунок 7).

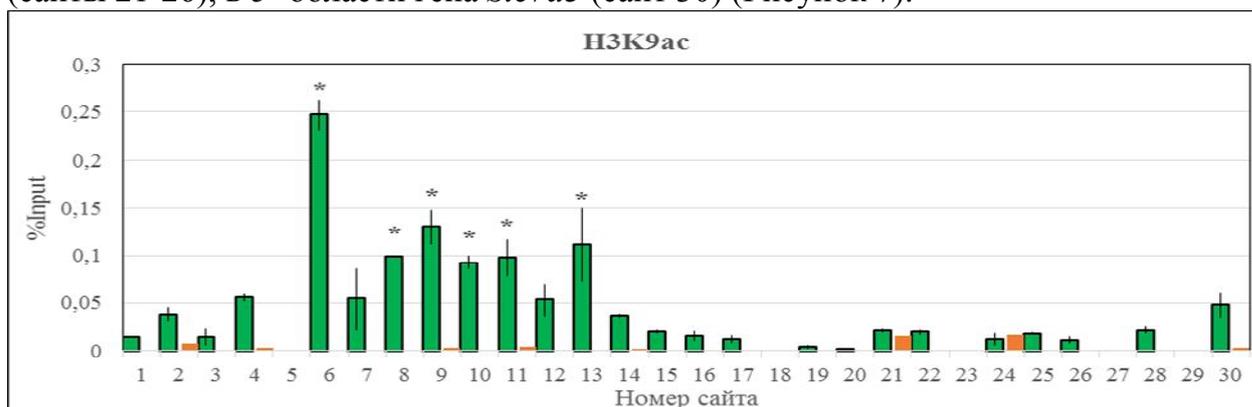


Рисунок 5. Паттерн ацетилирования H3K9 в локусе ХИС в фибробластах *M. levis*.

Результаты ПЦР анализа в реальном времени реакций ChIP с использованием антител против H3K9ac. По оси абсцисс расположены сайты, ограниченные парами праймеров, по оси ординат – количество ДНК, выраженное в процентах от Input хроматина. Темно-оранжевые столбики – отрицательный контроль (ChIP реакция без антител). Звездочками обозначены точки, демонстрирующие достоверное увеличение уровня H3K9ac по сравнению со средним значением в локусе, $P < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Фишера).

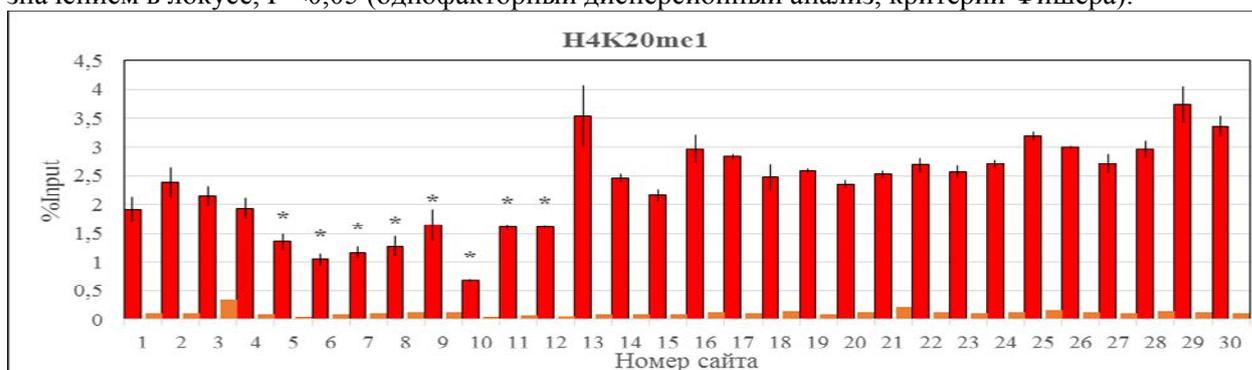


Рисунок 6. Паттерн монометилирования H4K20 в локусе ХИС в фибробластах *M. levis*.

Результаты ПЦР анализа в реальном времени реакций ChIP с использованием антител против H4K20me1. По оси абсцисс расположены сайты, ограниченные парами праймеров, по оси ординат – количество ДНК, выраженное в процентах от Input хроматина. Темно-оранжевые столбики – отрицательный контроль (ChIP реакция без антител). Звездочками обозначены точки, демонстрирующие достоверное снижение уровня H4K20me1 по сравнению со средним значением в локусе, $P < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Фишера).

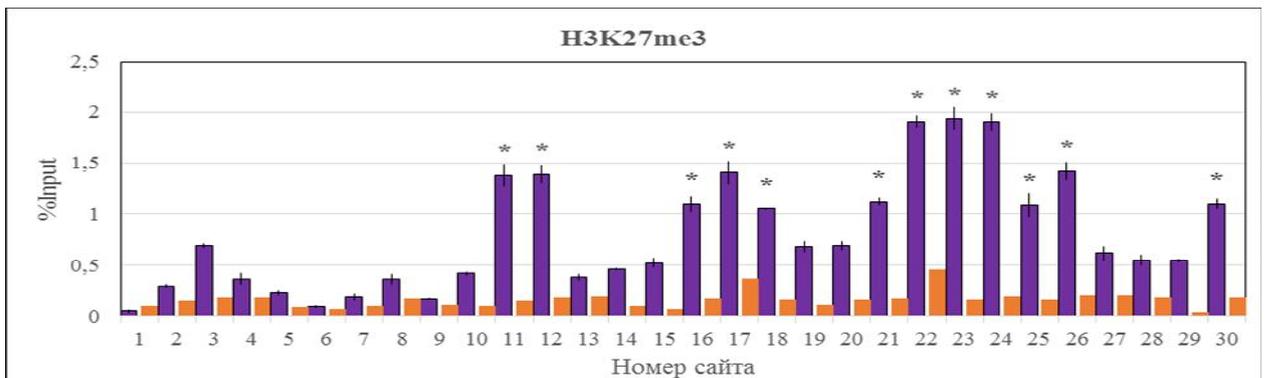


Рисунок 7. Паттерн триметилирования H3K27 в локусе ХИС в фибробластах *M. levis*. Результаты ПЦР анализа в реальном времени реакций ChIP с использованием антител против H3K27me3. По оси абсцисс расположены сайты, ограниченные парами праймеров, по оси ординат – количество ДНК, выраженное в процентах от Input хроматина. Темно-оранжевые столбики – отрицательный контроль (ChIP реакция без антител). Звездочками обозначены точки, демонстрирующие достоверное увеличение уровня H3K27me3 по сравнению со средним значением в локусе, $P < 0,05$ (однофакторный дисперсионный анализ, критерий Фишера).

Расположение ориджинов репликации и всех модификаций гистонов в локусе ХИС отображено на Рисунке 8. Таким образом, для наиболее эффективного ориджина репликации в локусе ХИС в фибробластах самцов *M. levis* характерно наличие H3K9ac и H3.3, низкий уровень H4K20me1, и отсутствие в значительной области ориджина H3K27me3. Вероятно, данный набор модификаций гистонов может способствовать повышению эффективности данного ориджина.

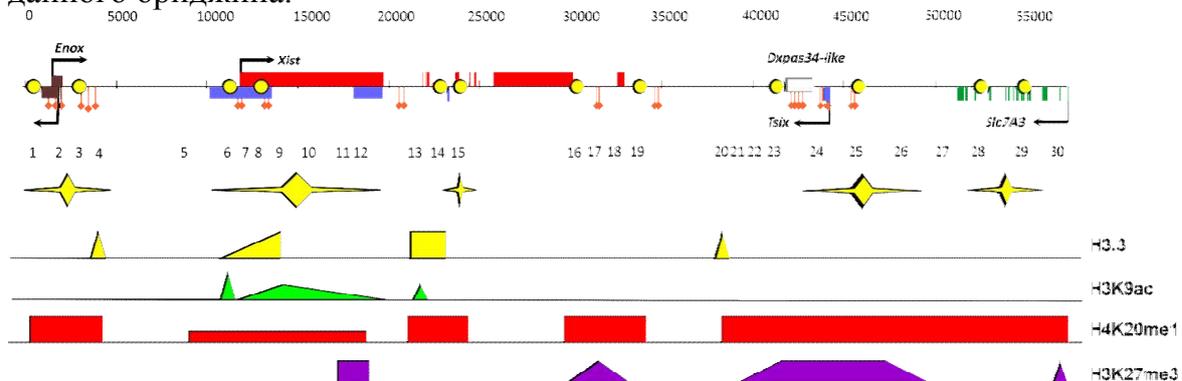


Рисунок 8. Схема расположения ориджинов репликации, гистона H3.3 и исследованных модификаций гистонов в локусе ХИС *M. levis*.

Вверху: Схема локуса ХИС. Экзоны генов отображены прямоугольниками, направление транскрипции показано стрелками, оранжевые точки – CGI. Цифрами внизу обозначено расположение пар праймеров, используемых в работе. Ориджины репликации обозначены желтыми звездочками, сайты связывания ORC – желтыми кружками.

Внизу: Схематичное расположение модификаций гистонов и гистона H3.3 в локусе ХИС *M. levis*.

7. Сравнение расположения ориджинов репликации в локусах ХИС *M. musculus* и *M. levis*

Несмотря на значительное количество картированных в последние несколько лет ориджинов репликации в геномах мыши и человека, вопрос о консервативности расположения и активности ориджинов в ортологичных участках геномов млекопитающих остается открытым. Ранее в части локуса ХИС *M. musculus* размером около 80 т.п.н. были картированы ориджины репликации в

ЭС и соматических клетках (Gomez, Brockdorff, 2004; Rowntree, Lee, 2006). Данная область локуса ХИС мыши имеет значительное сходство с локусом ХИС полевки (Nesterova *et al.*, 2001; Shevchenko *et al.*, 2011). Как у мыши, так и у полевки в локусе ХИС были выявлены ориджины репликации, которые располагаются в районе гена *Enox*, в первом экзоне и промоторе гена *Xist* и в районе промотора гена *Tsix* (Рисунок 9). Однако, в расположении и активности ориджин репликации в локусах ХИС полевки и мыши наблюдаются и некоторые различия. Так, в четвертом экзоне гена *Xist* *M. levis* расположен активный ориджин, который не был выявлен у мыши. В седьмом интроне гена *Xist* мыши расположен активный ориджин и сайт связывания ORC. В данном районе гена *Xist* *M. levis* выявляется связывание ORC, однако, инициация репликации в данном районе не наблюдалась ни в одном из исследованных типов клеток. Таким образом, в локусах ХИС *M. levis* и *M. musculus* выявляются как консервативные, так и варибельные ориджины репликации, что может быть связано с механизмами регуляции генов в данном локусе, которые имеют как сходства, так и различия у данных видов млекопитающих.

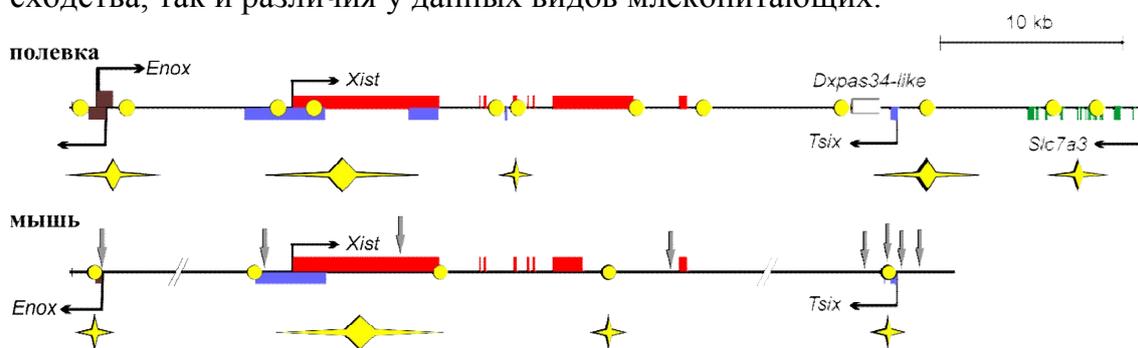


Рисунок 9. Сравнение расположения ориджин репликации в локусе ХИС *M. levis* (вверху) и *M. musculus* (внизу).

Экзоны генов отображены прямоугольниками, направление транскрипции показано стрелками, оранжевые точки – CGI. Ориджины репликации обозначены желтыми звездочками, сайты связывания ORC – желтыми кружками, серыми стрелками обозначены сайты гиперчувствительные к ДНКазе I (Gomez, Brockdorff, 2004; Rowntree, Lee, 2006; Tsai *et al.*, 2008).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ориджины репликации представляют собой важный элемент генома и необходимы для инициации процесса репликации ДНК. Отсутствие консенсусной последовательности ориджин у высших эукариот ставит перед исследователями нетривиальную задачу по их выявлению и изучению. Развитие технологий полногеномного секвенирования позволило исследователям выявить множество ориджин репликации в геномах мыши и человека. В ряде исследований было продемонстрировано, что значительная часть ориджин организована в зоны инициации репликации. Однако, механизмы, определяющие локализацию и активность ориджин, остаются малоизученными. Полногеномные исследования позволяют определить ассоциацию определенной части ориджин с теми или иными факторами в геноме. Тем не менее, для выявления факторов непосредственно осуществляющих регуляцию ориджин необходимо изучение отдельных ориджин и зон инициации репликации. В настоящей работе был проведен

поиск ориджинов репликации в центре инактивации X-хромосомы полевки *M. levis*. В результате было установлено, что данный локус представляет собой зону инициации репликации. В данном локусе было выявлено значительное количество районов связывания ORC, что также свидетельствует в пользу данного предположения. Основным фактором регуляции эффективности ориджинов репликации считается структура хроматина. Наиболее эффективный ориджин в центре инактивации X-хромосомы полевки *M. levis* характеризуется открытой структурой хроматина, что свидетельствует в пользу данной гипотезы.

На данный момент в геномах млекопитающих, за исключением мыши и человека, картировано незначительное количество ориджинов репликации. Проведенный сравнительный анализ ориджинов в центре инактивации X-хромосомы полевки и мыши позволил выявить консервативные и варибельные ориджины репликации. Различия в модификациях гистонов и эффективности различных ориджинов репликации у мыши и полевки в данном локусе, в частности в первом экзоне гена *Xist*, указывают на влияние данных модификаций на эффективность ориджинов репликации. Дальнейшие работы по полногеномному сравнению локализации и характеристик ориджинов репликации у близкородственных видов млекопитающих, таких как мышь и полевка могут пролить свет как на принципы локализации ориджинов репликации в геномах млекопитающих, так и на их регуляцию.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что центр инактивации X-хромосомы полевки *M. levis* представляет собой зону инициации репликации, в состав которой входят пять ориджинов репликации, представленных множеством точек инициации репликации.
2. Показано, что относительная эффективность ориджинов репликации в локусе XIC *M. levis* зависит от типа клеток.
3. Расположение комплекса распознавания ориджинов подтверждает наличие ориджинов репликации в установленных районах. Показано, что на каждый ориджин приходится в среднем по два комплекса распознавания ориджинов.
4. Наиболее эффективный ориджин репликации в локусе XIC в фибробластах *M. levis* расположен в промоторе и первом экзоне гена *Xist*. В районе данного ориджина выявляются гистон H3.3 и ацетилированный H3K9, а также наблюдается сниженный уровень метилирования H4K20 по сравнению со всем локусом.
5. Ориджины репликации, расположенные в районе гена *Enox*, в промоторе и первом экзоне гена *Xist* и в районе промотора гена *Tsix* консервативны у *M. levis* и *M. musculus*. 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.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Orishchenko K.E., Pavlova S.V., Elisaphenko E.A., **Sherstyuk V.V.**, Prinz A.V., Shevchenko A.I., Dementyeva E.V., Zakian S.M. A regulatory potential of the Xist gene promoter in vole *M. rossiaemeridionalis* // PLoS ONE. - 2012. - V. 7. - № 5. - P. e33994
2. **Шерстюк В.В.**, Шевченко А.И., Мазурок Н.А., Закиян С.М. Активность ориджинов репликации в центре инактивации X-хромосомы полевки в различных типах клеток // Доклады академии наук. - 2013. - Т. 450. - № 5. - С. 606-608
3. **Sherstyuk V.V.**, Shevchenko A.I., Zakian S.M. Epigenetic landscape for initiation of replication // Chromosoma. - 2014. - V. 123. - № 3. - P. 183-199
4. **Шерстюк В.В.** Картирование сайтов инициации репликации в центре инактивации X-хромосомы полевки *Microtus rossiaemeridionalis* // Материалы XLIX международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс», г. Новосибирск, 2011, стр. 264
5. **Шерстюк В.В.** Эпигенетическая характеристика сайтов связывания комплекса белков распознавания ориджинов репликации в центре инактивации X-хромосомы полевки *Microtus levis* // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых Ломоносов-2013, секция «биология», г. Москва, 2013, стр. 95

